

乳児期マウス小腸吸収上皮細胞における
Rab7 タンパク質の機能解析

瀧本 亜耶
(**TAKIMOTO Aya**)

同志社女子大学大学院
薬学研究科 医療薬学専攻

目次

本論文で用いた略号.....	5
序章.....	7
小胞輸送の基本的メカニズム.....	7
エンドサイトーシス経路の制御因子.....	9
小胞輸送制御における低分子量 G タンパク質の機能.....	10
エンドサイトーシス経路の膜動態を制御する Rab の機能.....	11
マウス初期胚臓側内胚葉における Rab7 の役割.....	14
哺乳動物の乳飲期小腸吸収上皮細胞の特徴およびマウス初期胚臓側内胚葉細胞との共通点.....	16
第 1 章 腸上皮特異的 Rab7 コンディショナル・ノックアウトマウスの作製.....	19
研究目的.....	19
結果.....	20
第 1 節 胎児期 (18.5 dpc) 腸上皮特異的 Rab7 コンディショナル・ノックアウトマウスの小腸上皮における Rab7 欠損効率の確認.....	20
第 1 項 腸管 whole mount を用いた X-gal 染色アッセイ.....	20
第 2 項 腸粘膜ライゼートを用いた抗 Rab7 抗体によるウエスタンブロット.....	20
第 3 項 抗 Rab7 抗体を用いた腸管 whole mount 蛍光免疫染色.....	21
第 2 節 乳児期 (P2) 腸上皮細胞特異的 Rab7 コンディショナル・ノックアウトマウスの小腸上皮における Rab7 欠損効率の確認.....	22
第 1 項 腸粘膜溶解液を用いた抗 Rab7 抗体によるウエスタンブロット.....	22
第 2 項 抗 Rab7 抗体を用いた腸管 whole mount 蛍光免疫染色.....	22
まとめ.....	22
第 2 章 新生児 (P2) マウスの ctrl および Rab7 欠損小腸吸収上皮細胞における形態学的	

解析.....	23
研究目的.....	23
結果.....	25
第1節 ctrl および cKO マウスの消化管の形態学的解析.....	25
第2節 組織染色および電子顕微鏡を用いた形態学的解析.....	25
第1項 Hematoxylin & eosin (HE) 染色による組織学的解析.....	25
第2項 透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope, TEM) を用いた組織学的解析.....	25
まとめ.....	26
第3章 P2 ctrl および cKO 小腸吸収上皮細胞におけるエンドサイトーシス経路関連分子マーカーを用いた蛍光免疫染色.....	27
研究目的.....	27
結果.....	27
第1節 抗 SNX1 抗体、抗 Rab7 抗体、抗 Lamp2 抗体を用いた小腸 whole mount 蛍光免疫染色および cKO 小腸吸収上皮細胞との比較.....	27
第2節 抗 Stx7 抗体、抗 Rab7 抗体、抗 Lamp2 抗体を用いた小腸 whole mount 蛍光免疫染色および cKO 小腸吸収上皮細胞との比較.....	28
まとめ.....	28
第4章 新生児期マウス ctrl および cKO 腸管を用いた uptake 実験.....	30
研究目的.....	30
結果.....	30
第1節 腸管試料を用いた <i>in vitro</i> uptake アッセイの説明.....	30
第2節 P2 ctrl および cKO 腸管試料を用いた <i>in vitro</i> uptake アッセイ.....	31
まとめ.....	32

第 5 章 Rab7 欠損 VE 細胞および Rab7 欠損小腸吸収上皮細胞の表現型の違いについて	33
.....	33
研究目的.....	33
結果.....	34
第 1 節 P2 ctrl および cKO 絨毛基底部、基底部周辺、先端部の小腸吸収上皮細胞に存在するオルガネラサイズの比較.....	34
第 2 節 出生直前 (18.5 dpc) の ctrl および cKO 小腸吸収上皮細胞の hematoxylin & eosin 染色による形態解析.....	34
第 3 節 出生直前 (18.5 dpc) の ctrl および cKO 腸管試料を用いた <i>in vitro</i> uptake アッセイ	35
.....	35
まとめ.....	36
第 6 章 乳児期 Rab7 欠損マウスにおける成長遅延.....	37
研究目的.....	37
結果.....	37
第 1 節 ctrl および cKO マウスの母乳の摂食行動の確認.....	37
第 2 節 出生直前から離乳までの ctrl および cKO マウスの体重測定.....	37
まとめ.....	37
考察.....	38
実験材料と方法.....	41
1. 実験動物.....	41
2. 腸組織を用いた遺伝子型解析.....	41
2. 1. PCR 用腸溶解液の作製.....	41
2. 2. PCR 法およびアガロースゲル電気泳動法による PCR 産物の検出.....	41
3. 組織学的解析.....	43

3. 1. 1. 腸のテクノビット標本作製および切片作製.....	43
3. 1. 2. ヘマトキシリン・エオジン染色、封入および観察.....	43
3. 2. 腸の透過型電子顕微鏡標本の作製および観察.....	44
4. ホールマウント (Whole mount) 小腸の蛍光免疫染色	44
5. 腸管の whole mount を用いた X-gal 染色アッセイ.....	45
5. 1. 胎児マウス (18.5dpc) の摘出.....	45
5. 2. Whole mount 小腸を用いた X-gal 染色アッセイ	46
6. 腸管試料を用いた <i>in vitro</i> uptake アッセイ	46
7. 免疫ブロッティング.....	47
7. 1. 小腸ライゼートの調製.....	47
7. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 法及びウエスタンブロッティ ング.....	48
8. 体重測定.....	49
9. 統計的解析.....	49
謝辞.....	50
参考文献.....	51
図表.....	58

本論文で用いた略号

MVB : multivesicular body

Rab : ras gene in rat brain

Arf : ADP-ribosylation factor

GTP : guanosine triphosphate

SNARE : soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors

NSF : N-ethylmaleimide-sensitive factor

α -SNAP : soluble NSF-attachment protein

VAM : vacuolar morphology

VPS : vacuolar protein sorting

Stx : syntaxin

Ypt : yeast protein two

Sec : secretory

Sec17p : *SEC17*-encoded protein

Sec18p : *SEC18*-encoded protein

ATP : adenosine triphosphate

SM : Sec1/Munc18

HOPS : homotypic fusion and vacuole protein sorting

GDP : guanosine diphosphate

REP : Rab escort protein

GGT : geranylgeranyl transferase

GEF : guanine nucleotide exchange factor

GAP : GTPase-activating protein

GDI : GDP dissociation inhibitor

LECA : last eukaryotic common ancestor

Mon1-Ccz1 : monensin-sensitivity 1/calcium caffeine zinc sensitivity 1

PtdIns3P : phosphatidylinositol 3-phosphate

PtdIns (3,5) P₂ : phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate

EE : early endosome

LE : late endosome

v-SNARE : vesicular-SNARE

t-SNARE : target-SNARE

VE : visceral endoderm

ExE : extra-embryonic ectoderm

AV : apical vacuole

Lamp2 : lysosome-associated membrane protein-2

IgG : immunoglobulin G

TJ : tight junction

NEC : necrotizing enterocolitis

FcRn : neonatal Fc receptor

序章

ヒトを含むすべての生物の体の最小単位は細胞であり、栄養の摂取、エネルギーの産生、老廃物の処理などをはじめとする、ほとんどの生命現象は細胞単位で行われている。エンドサイトーシスは真核生物の細胞に普遍的に備わる機能であり、細胞による外部からの栄養物質の取り込み、神経伝達物質の放出サイクル、免疫応答反応等、様々な生命現象において非常に重要である。

エンドサイトーシスはクラスリン被覆小胞を介して、様々な細胞外分子や細胞膜タンパク質などを細胞内に取り込む機構である。これらの取り込まれた分子は、小胞輸送を介して、初期エンドソームに輸送された後、後期／多小胞体エンドソーム (multivesicular body, MVB) を経て最終的にリソソーム／液胞で分解される (図 1)。この一連の輸送経路は、Rab、ADP-ribosylation factor (Arf)をはじめとする多数の低分子量 GTPase (G タンパク質) により協調的に制御されている (Palm and Thompson, 2017; Watts, 2012; Xie et al., 2017)。

小胞輸送の基本的メカニズム

小胞輸送の基本的なメカニズムは、出芽、輸送、係留および融合の4つのステップから成り立つ (Bonifacino, 2014; Bonifacino and Glick, 2004)。まず、小胞を覆うコートタンパク質がドナーコンパートメント (送り手側) 膜の特定領域に集まった後、輸送するタンパク質 (積み荷) が選別され、G タンパク質などの小胞輸送関連タンパク質もリクルートされる。次に、この特定領域の膜が細胞質側に陥入し (出芽)、くびり取られることで積み荷を乗せた小胞が形成される。その後、この小胞はコートタンパク質を遊離し (脱コート)、細胞骨格に沿ってアクセプターコンパートメントへ輸送される (輸送)。輸送された小胞は小胞膜上の G タンパク質とアクセプターコンパートメント (送り手側) の膜に局在する係留タンパク質との相互作用によりアクセプターコンパートメントに係留される。最後に膜架橋構造を形成する SNARE タンパク質により小胞とアクセプターコンパートメントの膜融合が行われることで、一連のメンブレントラフィックが完了する。

SNARE タンパク質は、1993 年に Rothman らが発見し、1998 年には精製 SNARE タンパク質と人

工脂質二重膜リポソームから、SNARE 依存性プロテオリポソーム膜融合を *in vitro* で完全再構成することに初めて成功した。SNARE の特異的シャペロンタンパク質である NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor)、 α -SNAP (soluble NSF-attachment protein)、そして SM (Sec1/Munc18) タンパク質は、SNARE タンパク質複合体の解離会合を制御すると考えられている。一方、出芽酵母を用いた遺伝学・細胞生物学的研究から、SNARE 以外の他の膜融合遺伝子群の重要性も数多く報告されてきた。

エンドサイトーシス経路の制御因子

出芽酵母はエンドサイトーシスを含む細胞膜小胞研究の非常に優れたモデル生物である。エンドサイトーシス経路の制御因子の多くは、出芽酵母を用いた解析から同定されている。酵母の液胞は、内部が酸性に保たれ、物質の分解およびその分解物の再利用を担っているという点から、哺乳動物がもつリソソームと相同のオルガネラだと考えられている。酵母を用いた研究から、液胞形成に関わる *VAM* (Vacuolar morphology) / *VPS* (Vacuolar protein sorting) 遺伝子群が同定された(Wada et al., 1992)。 *VAM* 遺伝子は9種類同定されており、それらは変異株の表現形によって2つのクラスに分類できる(表1)。それらの遺伝子変異株で液胞の消失がみられるものをクラスIとし、一方、液胞が多数の小胞の形で変異株内に蓄積する多小胞体構造がみられるものをクラスIIと呼ぶ。 *VAM1*、 *VAM5*、 *VAM8*、 *VAM9* の4種類の遺伝子はクラスIIに、 *VAM2*、 *VAM3* (*Stx7*)、 *VAM4* (*YPT7*)、 *VAM6*、 *VAM7* の5種類の遺伝子はクラスIIIに分類される。そして2008年に、従来からのSNAREタンパク質に加えて、2種類のSNAREシャペロン複合体(NSF/SNAPのホモログであるSec17p/Sec18p/ATP複合体、およびSMタンパク質を含むHOPS (homotypic fusion and vacuole protein sorting) 複合体)が同定された(Mima et al., 2008)。これらのテザリング分子の多くはRabやArfファミリーの低分子量Gタンパク質の局在場所によって特定の場所にリクルートされ、RabまたはArf、それからSNARE複合体との相互作用を介して、輸送小胞をアクセプターコンパートメントへ係留する(図2)。

小胞輸送制御における低分子量 G タンパク質の機能

低分子量 G タンパク質は小胞輸送のすべてのステップを制御する。細胞内の小胞形成および小胞輸送の調整を行うメンバーは Arf と Rab である(Arrazola Sastre et al., 2021)。Arf および Rab は、Ras スーパーファミリーに所属するサブユニット構造をもたない 20-30kDa 程度の低分子量 G タンパク質である。これらの G タンパク質は脂質化修飾を受けて膜に固定され、GTP が結合する活性型の状態および GDP が結合する不活性型の状態を繰り返す分子スイッチとして機能する(Arrazola Sastre et al., 2021)。Arf の機能は出芽の調節で、コートタンパク質を介した積み荷の選別、膜の弯曲および小胞形成の促進までのメンブレントラフィックの初期のステップを制御する。一方、Rab は小胞輸送の一連のステップをすべて制御し、出芽、細胞骨格に沿った輸送、およびテザリング分子や SNARE 複合体との相互作用を介した膜融合を調節する。

G タンパク質の活性型または不活性型へのスイッチングはさまざまな制御因子で調節されている(Hutagalung and Novick, 2011)。Rab のスイッチ on-off 調節機構について詳細を述べるとまず、翻訳された GDP 結合型 Rab が Rab エスコートタンパク質 (REP) に結合し、Rab ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ (Rab GGT) の触媒作用により脂質化修飾を受け、C 末端でゲラニルゲラニル基が付加される (プレニル化)。続いてこの GDP 結合型 Rab のプレニル基が標的膜へ挿入され、グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) の作用により不活性型 Rab に結合した GDP の解離および GTP の結合が生じることで活性型 Rab が形成される。その後、Rab の不活化には GTP ase 活性化タンパク質 (GAP) が活性型 Rab に結合し、GTP を GDP へ加水分解するという過程を経ることで、Rab が不活化状態へ戻る。不活化した Rab はグアニンヌクレオチド解離阻害因子 (GDI) との結合により疎水性脂質化修飾部位が覆われ、細胞質中に戻る。このような GEF と GAP サイクルを介した機構が Rab の分子スイッチとしての機能を調節する。

エンドサイトーシス経路の膜動態を制御する Rab の機能

Ras スーパーファミリー中でも最大のファミリーを形成する Rab (Ras gene in rat brain) は、1987 年に Touchot らにより、ラット脳組織 cDNA ライブラリーにより Ras と相同性が高い遺伝子として単離されたことで発見された(Touchot et al., 1987)。Rab は多数のアイソフォームから成り立ち、全ての真核細胞で普遍的に保存され、あらゆる組織で行われる小胞輸送の制御因子として全身で発現している。アイソフォームの数は生物種により異なり、ヒトやマウスではこれまでに 60 種類以上が報告されているが、コア Rab と呼ばれる 5 つのセット (Rab1、Rab5、Rab6、Rab7、Rab11) が酵母から後生成物、真菌、植物で進化的で保存されている(Dunst et al., 2015)。Rab ファミリーは真核生物の共通祖先 (last eukaryotic common ancestor ; LECA) に存在した 15 から 23 種類の Rab をコアとして拡大し、これらの Rab は細胞間コミュニケーション、組織のパターニング、分化した細胞の機能に必要な小胞輸送経路のさらなる複雑性を反映すると考えられている(Dunst et al., 2015)。

Rab ファミリーに属するそれぞれのメンバーは特定のオルガネラ膜に局在し、エンドサイトーシス経路の膜動態を制御する。エンドサイトーシス経路は細胞表面および細胞外の分子を細胞の中に輸送するための主要な経路を構成している。最初に、細胞膜の一部がくびれとられエンドサイトーシス小胞を形成する。エンドサイトーシス小胞はまず、Rab5 や Rab4 が局在する初期エンドソームを形成し、やがて初期エンドソームは後期エンドソームへと成熟する。このエンドソームの成熟には Rab5/Rab7 置換が必要で、成熟した後期エンドソームには Rab7 が局在する。後期エンドソームは最終的に加水分解酵素を含むリソソームへ輸送され、リソソームとの融合反応が行われるが、この過程には Rab7 の機能が必要である。

エンドソーム成熟中の Rab5/Rab7 置換には Mon1/Ccz1 複合体が関与する。(Casanova and Winckler, 2017; Huotari and Helenius, 2011)。Rab5/Rab7 置換のステップにおいてはまず、Rab5 のエフェクターである Mon1/Ccz1 複合体が活性型 Rab5 およびホスファチジルイノシトール 3 - リン酸 (PtdIns3P) を介して初期エンドソーム (EE) 膜上にリクルートされる(Huotari and Helenius, 2011)。この複合体は Rab7 の GEF としても機能し、Rab7 の膜上へのリクルートおよび活性化を促進する

ことで、一時的に Rab5/Rab7 がハイブリッドされたエンドソームが形成される(Huotari and Helenius, 2011)。活性型 Rab7 が形成されると同時に、Rab5 の別のエフェクターである Rabaptin と Rabex5 (Rab5 の GEF) の複合体が Mon1-Ccz1 複合体との相互作用により Rab5 から解離する(Huotari and Helenius, 2011)。その際、Rab5 は不活化され EE 膜から解離し、Rab7 が局在する後期エンドソーム (LE) の形成が完了する(Huotari and Helenius, 2011)。

さらにエンドソームの成熟には Rab 置換に加え、ホスファチジルイノシトール (PtdIns) 変換も伴う (図 3) (Casanova and Winckler, 2017)。ホスファチジルイノシトールは Rab と同様に、PtdIns3P と PtdIns(3,5)P₂ がそれぞれ、EE および LE の機能とアイデンティティを確立する(Casanova and Winckler, 2017)。エンドサイトーシスで形成された EE の膜上ではまず、Rab5 を介して Vps34、Beclin、Vps15 の複合体であるホスファチジルイノシトール 3 - キナーゼ (PI3K ; class III phosphatidylinositol 3-kinase) がリクルートすると、膜上の PtdIns が PtdIns3P へと変換される(Casanova and Winckler, 2017; Huotari and Helenius, 2011)。Rab5 と PtdIns3P は EE - EE 間の融合 (同型融合) に必要で、それぞれ EEA1 (Rab5 のエフェクター) と相互に作用することで行われる(Das and Lambright, 2016)。つぎに、ホスファチジルイノシトール 3 - リン酸 5-キナーゼ (type III phosphatidylinositol phosphate kinase (PIPKIII) ; 哺乳類では PIKfyve、酵母では Fab1) が PtdIns3P を PtdIns(3,5)P₂ に変換をすることで、LE が形成される(Casanova and Winckler, 2017; Huotari and Helenius, 2011)。この酵素は N 末端から C 末端にかけて FYVE ドメイン、システインリッチドメイン、シャペロン様ドメイン、PIPK 触媒ドメインを有する(Botelho et al., 2008)。PIKfyve は FYVE ドメインを介した PtdIns3P への結合によりエンドソーム膜上へリクルートされ、PIPK 触媒ドメインにより PtdIns3P はリン酸化される(Ho et al., 2012)。このようにエンドソームの成熟では Rab 置換と PtdIns 変換が同時に進行し、その膜動態が制御されている。

LE 膜にリクルートした Rab7 は HOPS 複合体との相互作用を介して LE - リソソーム間で行われる係留と融合を制御する (図 3) (Balderhaar and Ungermann, 2013)。HOPS 複合体は Vps11、Vps16、Vps18、Vps33、Vps39、Vps41 から構成されるタツノオトシゴのような形をしたテザリング因子で、

大きなヘッドドメインと小さなテールドメインを持つ(Balderhaar and Ungermann, 2013; Brocker et al., 2012)。ヘッド側には Vps41 (Vam2)、テール側には Vps39 (Vam6) が存在し、これらのドメインは活性型 Rab7 と結合する(Brocker et al., 2012)。LE - リソソーム間の膜融合においてはまず、リクルートされた HOPS 複合体の Vps41、Vps39 がそれぞれ後期エンドソームに局在する Rab7 およびリソソームに局在する Rab7 に結合し、テザリングとしての機能を果たす(Balderhaar and Ungermann, 2013; Brocker et al., 2012)。そして、HOPS 複合体のヘッド側に存在する Vps16-Vps33 のサブユニットダイマーによる SNARE のシャペロン活性を利用することで、v-SNARE および t-SNARE のアセンブリの促進および SNARE 複合体の形成が完了する(Balderhaar and Ungermann, 2013)。この過程を経て、LE - リソソーム間の膜融合が促進し、LE とリソソームが直接融合したエンドリソソームもしくはリソソームが形成される。これらの融合のプロセスはエンドソームやエンドリソソームの内腔から放出されるカルシウム (Ca^{2+}) によって制御されている(Luzio et al., 2007b)。 Ca^{2+} は LE - リソソーム間での、オルガネラの消費の抑制やオルガネラ内腔の内容物の凝集を行うための、リソソームの再構成に関与する(Luzio et al., 2007b)。

マウス初期胚臓側内胚葉における Rab7 の役割

原腸陥入前のマウス初期胚（受精後 5.5~6.5 日）は、臓側内胚葉（visceral endoderm ; VE）、胚体外胚葉（extra-embryonic ectoderm ; ExE）、胚体外胚葉（epiblast）からなる、egg cylinder と呼ばれるカップ状の構造をしている(Tam and Behringer, 1997)。胎盤が形成されていないこの段階では、VE は栄養の取り込みと輸送、様々な成長因子のシグナル伝達に関与しており、エピブラストのパターン形成に重要な役割を果たしている(Bielinska et al., 1999)。栄養補給とパターン形成の両方の機能は、VE 細胞のエンドサイトーシス経路に大きく依存している(Kawamura et al., 2012; Kawamura et al., 2020)。VE 細胞は、極性を持つ上皮系細胞で、頂端液胞 apical vacuole (AV) と呼ばれる特徴的なリソソーム様オルガネラが発達している(Kawamura et al., 2012)。AV の限界膜にはリソソームの膜タンパク質である Lamp2 や後期エンドソーム/リソソームの SNARE である Stx7、それから Rab7 が局在し(Kawamura et al., 2012)、さらに AV 内部ではリソソームのプロテインキナーゼであるカテプシン B や VE 細胞に内在化した母体側から供給される IgG が蓄積していることから、AV がリソソームのように分解機能として働くオルガネラであることが知られている(Kawamura et al., 2012)。

マウス初期胚 VE 細胞の apical vacuole で行われるエンドソーム特異的なマイクロオートファジーは初期胚発生に不可欠である(Kawamura et al., 2012)。VE 細胞頂端膜の表面および細胞外の高分子物質はエンドサイトーシスにより形成されたエンドソームで細胞内部に輸送される。エンドソームは最終的に AV にたどり着き、AV 膜と融合することが確認されている(Kawamura et al., 2012)。この AV の形成には通常の小胞同士が膜融合する「カノニカル」な輸送の他に、エンドソームを丸ごと取り込んでから膜を消化する「マイクロオートファジー」による輸送が関与することがリパーゼ阻害剤を用いた実験から明らかとなっている(Kawamura et al., 2012)。

しかし、Rab7 欠損 VE 細胞ではマイクロオートファジーが進行できず、AV の形成不全が生じる(Kawamura et al., 2012)。VE 細胞の AV は電子顕微鏡を用いた組織学的解析から、核の頂端 (apical) 側に電子密度の低い大きなオルガネラとして存在している(Kawamura et al., 2012)。しかし、Rab7 欠損では大きな AV は存在せず、代わりに電子密度が高い小さく断片化された小胞が蓄積する

(Kawamura et al., 2012)。この断片化した小胞は **Lapm2** 陽性ではあるが、母体側から供給され細胞内に内在化した **IgG** の局在とはオーバーラップせず、**Rab7** 欠損 **VE** 細胞ではエンドサイトーシス経路が阻害されている(Kawamura et al., 2012)。また、エンドサイトーシスで形成されたエンドソームは通常、最終的に **AV** と融合するが、**Rab7** 欠損 **VE** 細胞では小胞同士が融合せず、空間的に分離したままの膜動態を示し(Kawamura et al., 2012)、**AV** の形成には **Rab7** の機能が不可欠であることが報告されている。

さらにエンドサイトーシス経路を阻害された **Rab7** 欠損胚は中胚葉が形成されず胚発生が停止するため、**Rab7** 依存のエンドサイトーシス経路が初期胚の形態形成に重要であることも報告されている(Kawamura et al., 2012; Kawamura et al., 2020)。

哺乳動物の乳飲期小腸吸収上皮細胞の特徴およびマウス初期胚臓側内胚葉細胞との共通点

小腸吸収上皮細胞はマウス初期胚臓側内胚葉と同様に極性をもった上皮細胞である。小腸管腔内を覆う無数の絨毛突起を構成する一層の上皮細胞の約8割以上は小腸吸収上皮細胞が占めており (Snoeck et al., 2005)、栄養の消化と吸収機能、さらに外来異物に対するバリア機能を併せ持つ。腸管の内腔では、食物の成分や腸内細菌、病原菌や毒素など様々な内容物が通過する。栄養素などの必要な物質は小腸吸収上皮細胞を介して消化吸収されるが一方で、その他の不要な内容物の体内への侵入は過剰な免疫反応を惹起し、結果、腸炎を引き起こす。よって、これらの異物の侵入を防ぎ、腸管の恒常性を維持する目的で粘膜バリアと呼ばれる腸管バリア機能が存在する。粘膜バリアには粘液層による腸組織の保護やタイトジャンクション (TJ) による透過性の制御 (物理的バリア)、抗菌物質の産生による微生物環境の調整 (化学的バリア)、腸内細菌叢のバランス (環境的バリア) が関与し、通常はこれらの相互作用により宿主防衛の機能を果たす (Vancamelbeke and Vermeire, 2017)。しかし、粘膜バリアの破綻はリーキーガットと呼ばれる異物が組織に侵入しやすい状態を作り出し、新生児壊死性腸炎 (NEC) や食物アレルギー、糖尿病やアルツハイマーなど新生児から成人でさまざまな疾患を引き起こす (Moore et al., 2016; Mu et al., 2017)。

小腸吸収上皮細胞は絨毛基底部に存在する *intervillous pocket* の増殖性幹細胞から分化する。哺乳動物の小腸吸収上皮細胞は離乳の前後で構造的にも機能的にも大きく異なり、栄養の消化吸收システムがダイナミックに変化する。マウス小腸は出生後、約2週間で *intervillous pocket* の陥入が起こり成人期特有の構造である陰窩 (*crypt*) を形成し、パネート細胞は *crypt* 基底部に移り始める (Henning, 1985)。このような絨毛の構造的な変化と同時に、消化機能の変化も始まり、離乳後には完全に成熟したシステムをもつ小腸吸収上皮細胞に変化する。消化管の消化吸收機構の変化は主に母乳から固形食の摂取の変化を可能にする消化酵素が関与する。母乳成分は高脂肪かつラクトースが主成分の炭水化物で構成されている。出生から離乳までの未熟な腸細胞の刷子縁にはラクトースを分解するラクターゼの活性が高いが、離乳のタイミングである生後3週間後にはラクターゼの活性が低下する (Henning, 1985)。それに伴いスクラーゼやイソマルターゼ、トレハラーゼなどの発現が徐々に増

加し、成熟した細胞へと変化する(Henning, 1985; Navis et al., 2019)。この細胞は intervillous pocket の幹細胞から出現し、出生直後の絨毛を構成する未熟な小腸吸収上皮細胞から不可逆的に置き換わる。

乳児期の未熟な小腸吸収上皮細胞ではエンドサイトーシスによる栄養の吸収消化が活発に行われている。経口摂取より胃に到達した食べ物はまず胃液 (HCl) とぜん動運動により破壊され、適度に分解された食塊は徐々に小腸へ送られる。成人の胃では胃酸により活性化したペプシンがタンパク質を小腸の消化活動に適切した状態にまで加水分解し(Poquet and Wooster, 2016)、さらに小腸の管腔内消化酵素による分解を受けて、小腸吸収上皮細胞の刷子縁に発現するトランスポーターを介して吸収される(Louvard D, 1992; Pacha, 2000)。一方で、乳児の胃は未熟で胃液およびペプシノーゲンがほとんど分泌されず(Baintner, 2007; Poquet and Wooster, 2016)、また消化管の消化腺が未発達である(Gan et al., 2018)。よって母乳中に含まれるたんぱく質はほとんど分解作用を受けないまま小腸にまるごと届く。その後、小腸へ届いた母乳中の未消化のタンパク質は高分子物質として小腸吸収上皮細胞で活発に行われるエンドサイトーシスにより細胞内へ吸収され、核の apical 側に発達する大きなリソソーム様オルガネラである apical vacuole (AV) で分解される。栄養吸収消化システムとして働くこの膜動態は乳児の小腸吸収上皮細胞で発現するマルチリガンドレセプターの Cubilin/Megalin/Amnionless 複合体が関与し(Vazquez-Carretero et al., 2014)、マウス初期胚臓側内胚葉と共通のシステムが構築されている。

小腸吸収上皮細胞で活発なエンドサイトーシスは、母乳中の IgG を新生児の体内へ移行させるのに不可欠である。新生児期の小腸では離乳後にはほとんど喪失する免疫抗体 IgG のレセプター neonatal Fc receptor (FcRn) が多く発現している(Navis et al., 2019)。消化されずに小腸へ届いた母乳中の IgG は、小腸吸収上皮細胞の刷子縁に発現する FcRn に結合することでエンドサイトーシスにより取り込まれ、細胞内に内在化した FcRn-IgG 複合体はその後、トランスサイトーシスを介して基底外側のリンパ液へ放出される(Baintner, 2007; Pacha, 2000)。このプロセスを介して乳児の全身で循環が可能となった IgG は新生児期の受動免疫の獲得のほか、未熟な脳や腸などの組織の発達をサポートし、出生後の発育に大きく寄与する(Pierzynowska et al., 2020)。

したがって、小腸吸収上皮細胞で活発なエンドサイトーシスは乳児期の栄養の吸収消化システムとして構築されており、乳児期動物の発育に必要な前提条件となりうる。この高度に構築された膜系ネットワークを介して行われる小胞輸送の膜動態がさまざまなタンパク質により制御されていることが予測できるが、その詳細な膜構造や機能、メカニズムについては明らかにされていない。そこで本研究では、腸特異的 Rab7 欠損マウスを用いて、小腸吸収上皮細胞における Rab7 依存のエンドサイトーシス経路の機能について細胞および個体レベルで解析を行い、乳児期の未熟な細胞で行われる消化吸収システムの詳細を明らかにする。特に、出生後の発育や免疫の構築に重要な時期である新生児期 (postnatal day2, P2) に焦点を当て、研究を遂行する。

本研究は以下の論文にて発表した。

Takimoto, A. 2021. Rab7-Dependent Endocytic Pathways Play an Important Role in Nutrient Absorption during Pre-Weaning Growth. BPB Reports. 4:27-35.

第1章 腸上皮特異的 Rab7 コンディショナル・ノックアウトマウスの作製

研究目的

本研究では乳児期の小腸吸収上皮細胞での Rab7 の機能解析が目的である。しかしながら、全身の Rab7 機能が喪失したノックアウトマウス ($Rab7^{-/-}$) は、初期胚発生の停止により胎生致死に至る (Kawamura et al., 2012; Kawamura et al., 2020) ため、出生後の Rab7 の生理機能の解析が困難である。したがって、Cre/loxP システムを用いた Rab7 の腸上皮特異的コンディショナル・ノックアウトマウスを作製することで胎生致死を回避し、P2 マウスの小腸での Rab7 の機能解析を可能にした。

腸上皮特異的コンディショナル・ノックアウトマウスの作製にはまず、図 1-1 で示すように、 $Rab7^{lox/lox}$ マウス (Kawamura et al., 2012) と受精後 12.5 日目 (12.5 days post coitum, dpc) から腸上皮特異的に Cre リコンビナーゼを発現する *Villin-Cre* マウス (El Marjou et al., 2004) を交配させることで、 $Rab7^{lox/+}$; *Villin-Cre*^{Tg/+} マウスを作製した。さらに、 $Rab7^{lox/+}$; *Villin-Cre*^{Tg/+} 雄マウスと $Rab7^{lox/lox}$ 雌マウスを交配させることで腸上皮特異的 Rab7 コンディショナル・ノックアウトマウス ($Rab7^{lox/lox}$; *Villin-Cre*^{Tg/+} マウス) を樹立した。Cre による 2 カ所の loxP サイトに挟まれた配列の組換えにより、Rab7 のエクソン 2 (ATG 開始コドンを含む) とエクソン 3 が削除され、ヌル対立遺伝子 (null allele) が作製された。 $Rab7^{lox/lox}$; *Villin-Cre*^{Tg/+} マウスは期待されるメンデル比 ($Rab7^{lox/lox}$: $Rab7^{lox/lox}$; *Villin-Cre*^{Tg/+} = 247 (52.5%) : 223 (47.5%)) で誕生し、成熟期まで生存し、繁殖も可能であった。

この章では、上述したように作製した $Rab7^{lox/lox}$; *Villin-Cre*^{Tg/+} マウスの小腸上皮の Rab7 欠損効率を明らかにする。この目的を達成するためにまず、Cre 依存的に発現する *LacZ* reporter transgene を用いた X-gal 染色アッセイを胎児期 (18.5 day post coitum, dpc) [$Rab7^{lox/lox}$; *Villin-Cre*^{Tg/+}] 小腸組織で行い、P2 以前の小腸上皮の Cre の発現効率を確認する。さらに抗 Rab7 抗体を用いた蛍光免疫染色およびイミュノブロット法を行い、 [$Rab7^{lox/lox}$; *Villin-Cre*^{Tg/+}] 小腸上皮での Rab7 のタンパク質レベルでの発現量を確認する。

結果

第1節 胎児期 (18.5 dpc) 腸上皮特異的 Rab7 コンディショナル・ノックアウトマウスの小腸上皮における Rab7 欠損効率の確認

第1項 腸管 whole mount を用いた X-gal 染色アッセイ

18.5 dpc *Rab7^{flx/flx}* ; *VilCre^{Tg/+}*マウスの回腸吸収上皮細胞における Cre リコンビナーゼの発現効率を確認するため、*Gt (ROSA) 26 Sor^{tm1Sho}* Cre レポーター対立遺伝子 (ROSA26) (Mao et al., 1999) を用いた X-gal 染色アッセイを行った。ROSA26 とは ROSA26 領域に β ガラクトシダーゼおよびネオマイシンホスホトランスフェラーゼの融合遺伝子 (β geo) を導入後、その上流に 2 カ所の loxP 配列で挟まれたストッパー配列が挿入されたアリルである(Mao et al., 1999) (図 1-2、a)。Cre リコンビナーゼ存在下ではストッパー配列が削除されることで β geo が発現するため、この実験では Cre が発現する細胞で X-gal が加水分解を受けて青色の沈殿物を生成する。*Gt (ROSA) 26 Sor^{tm1Sho}* 遺伝子座を導入した *Rab7^{flx/flx}* ; *Gt (ROSA) 26 Sor^{tm1Sho}* および *Rab7^{flx/flx}* ; *VilCre^{Tg/+}* ; *Gt (ROSA) 26 Sor^{tm1Sho}* マウスの小腸を用いた X-gal 染色を行ったところ、*VilCre* 導入遺伝子をもった回腸では *VilCre* 導入遺伝子をもたない回腸に比べ回腸吸収上皮細胞が青く染色された (図 1-2、b)。*VilCre* 導入遺伝子をもたない回腸においてもやや青く染色されたのは、内在性 β -ガラクトシダーゼの発現によるものだと考えられる。

第2項 腸粘膜ライゼートを用いた抗 Rab7 抗体によるウエスタンブロット

18.5 dpc *Rab7^{flx/flx}* および *Rab7^{flx/flx}* ; *VilCre^{Tg/+}*マウスの小腸下部の粘膜溶解液を用いてウエスタンブロットにより Rab7 タンパク質の発現量を確認した結果、*Rab7^{flx/flx}* ; *VilCre^{Tg/+}*では Rab7 タンパク質が減少した (図 1-3、a)。さらに *Rab7^{flx/flx}* および *Rab7^{flx/flx}* ; *VilCre^{Tg/+}*における Rab7 および β -actin のバンド (図 1-3、a) をレーザーキャニングデンシトメーター (Image Quant LAS 4000 mini, Image Quant TL Analysis Toolbox, GE Healthcare) を用いて定量し、Rab7/ β -actin の相対量を両側 t 検定で 2 群間を比較したところ、 $p=0.003$ と 2 群間で有意な差を認めた (図 1-3、b)。

第3項 抗 Rab7 抗体を用いた腸管 whole mount 蛍光免疫染色

18.5 dpc *Rab7^{flx/flx}* および *Rab7^{flx/flx} ; VilCre^{Tg/+}* マウスの回腸を用いて抗 Rab7 抗体による蛍光免疫染色を行い、小腸吸収上皮細胞における Rab7 の局在を確認した。18.5 dpc *Rab7^{flx/flx}* マウスの小腸吸収上皮細胞頂端 (apical) 側には強い Rab7 のシグナルが観察された。エンドソーム上に発現する低分子量 GTPase の Rab7 が蓄積したというこの結果は、母乳未摂取の胎児の腸細胞においてもエンドサイトーシスの膜系構造が存在するという報告(Wilson JM, 1991)と一致した(図 1-4, a と b)。*Rab7^{flx/flx} ; VilCre^{Tg/+}* マウスでは、小腸吸収上皮細胞における apical 側の Rab7 のシグナルが顕著に減少した(図 1-4, c と d)。*[Rab7^{flx/flx}]* および *[Rab7^{flx/flx} ; VilCre^{Tg/+}]* 上皮細胞直下の粘膜固有層にも Rab7 のシグナルが観察されたが、これは図 1-3, a のメンブレンの中部で観察されたバンドのように、抗 Rab7 抗体の非特異反応によるシグナルの可能性はある。

第2節 乳児期 (P2) 腸上皮細胞特異的 Rab7 コンディショナル・ノックアウトマウスの小腸上皮における Rab7 欠損効率の確認

第1項 腸粘膜溶解液を用いた抗 Rab7 抗体によるウエスタンブロット

乳児期 (P2) *Rab7^{flox/flox}* および *Rab7^{flox/flox}; VilCre^{Tg/+}* マウスの小腸下部の粘膜溶解液を用いてウエスタンブロットにより Rab7 タンパク質の発現量を確認した結果、*Rab7^{flox/flox}; VilCre^{Tg/+}* では Rab7 タンパク質が減少した (図 1-5, a)。さらに *Rab7^{flox/flox}* および *Rab7^{flox/flox}; VilCre^{Tg/+}* における Rab7 および β -actin のバンド (図 1-5, a) をレーザースキャニングデンシトメーター (Image Quant LAS 4000 mini, Image Quant TL Analysis Toolbox, GE Healthcare) を用いて定量し、Rab7/ β -actin の相対量を両側 t 検定で 2 群間を比較したところ、 $p=4.5 \times 10^{-7}$ と 2 群間で有意な差を認めた (図 1-5, b)。

第2項 抗 Rab7 抗体を用いた腸管 whole mount 蛍光免疫染色

乳児期 (P2) *Rab7^{flox/flox}* および *Rab7^{flox/flox}; VilCre^{Tg/+}* マウスの回腸を用いて抗 Rab7 抗体による蛍光免疫染色を行い、小腸吸収上皮細胞における Rab7 の局在を確認した。P2 *Rab7^{flox/flox}* マウスの小腸吸収上皮細胞 apical 側には強い Rab7 のシグナルが観察された。一方で粘膜固有層では Rab7 のシグナル強度が顕著に下がった。エンドソーム上に発現する Rab7 が大量に蓄積したというこの結果は、乳児期の小腸吸収上皮細胞ではエンドサイトーシスが活発であるという知見と一致した (図 1-6, a と b)。*Rab7^{flox/flox}; VilCre^{Tg/+}* マウスでは、小腸吸収上皮細胞における Rab7 のシグナルが検出限界以下であった (図 1-6, c と d)。

まとめ

Rab7^{flox/flox}; VilCre^{Tg/+} マウスの小腸上皮では、18.5 dpc の時点ですでに Cre リコンビナーゼが発現しており、18.5 dpc 以降の小腸吸収上皮細胞では Rab7 がタンパク質レベルで減少していたことが分かった。以降、*Rab7^{flox/flox}* マウスは ctrl、*Rab7^{flox/flox}; VilCre^{Tg/+}* マウスは cKO と表記する。

第2章 新生児 (P2) マウスの ctrl および Rab7 欠損小腸吸収上皮細胞における形態学的解析

研究目的

離乳前の小腸吸収上皮細胞では、エンドサイトーシスによる消化吸収機構が発達している。小腸は食物を栄養に変換する重要な組織で、栄養の消化吸収は小腸吸収上皮細胞が行う。この細胞は極性を持つため、管腔側（頂端 (apical) 側）と基底膜側 (basal 側) に分けられる。apical 側には平滑な基底側 (basal 側) とは異なり、無数の微絨毛が並ぶ刷子縁が存在する。この構造は経胎盤から経腸栄養へ移って間もない出生直後にはすでに形成されている(Wilson JM, 1991)。管腔内に届いた栄養は、apical 側から細胞内へ取り込まれ、basal 側へ輸送された後、血液側へ移行する。離乳後、主に固形食から摂取した高分子の栄養は、胃や腸管腔内の消化酵素で低分子に分解され、細胞頂刷子縁膜に発現するトランスポーターで吸収される(Louvard D, 1992; Pacha, 2000)。一方で、母乳を栄養源とする離乳前の消化管は管腔内への消化酵素の分泌が十分でないため、母乳中の成分が低分子化せず、高分子の栄養が小腸管腔内へ届く。したがって、高分子物質を丸ごと細胞内へ取り込むエンドサイトーシスを介した消化吸収機構が発達し、取り込まれた栄養はリソソーム内で分解される(Gonnella and Neutra, 1984; Henning, 1985)。新生児期から離乳までの小腸吸収上皮細胞の微絨毛直下にはこの経路に関連する膜系構造が存在し、apical 側の細胞膜の陥入、管状小胞ネットワーク、エンドソーム、MVB、リソソームで構成される(Baba et al., 2002; Wilson JM, 1991)。

乳児期の小腸吸収上皮細胞で行われるエンドサイトーシス機構は小腸の部位によって異なる。小腸は胃側（近位側）から盲腸側（遠位側）にかけて十二指腸、空腸、回腸とよばれる部位で構成される(図 2-1)。これらの部位は明確な境界線はなく、近位側から遠位側へ機能と構造が徐々に変化する。たとえば、グルコースや脂質の取り込み量や絨毛の高さの違いが存在し、『jejunioileal』もしくは『proximodistal gradient』と呼ばれるこの勾配は胎児期から成人期まで存在する(Baba et al., 2002)。proximodistal gradient は遺伝的な要因に加え、近年では環境的な要因も関与する可能性が示唆されている(Drozdowski et al., 2010)。乳児期の小腸吸収上皮細胞も proximodistal gradient の要因の

一つで、小腸上部と下部での形態や機能の違いが関与する(Baba et al., 2002)。乳児の小腸近位側では脂質に加え、母体から供給される免疫グロブリン (IgG 等) を主に取り込む(Fujita et al., 2007)。IgG は近位の小腸吸収上皮細胞刷子縁膜に多く発現する IgG レセプター (Fc レセプター) に結合するとエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれ、小胞輸送を介して細胞間隙に輸送 (トランスサイトーシス) される(Fujita et al., 2007)。一方、小腸中間部と下部では液相エンドサイトーシスが活発であり、上部よりも取り込み量が多い(Clark, 1959)。加えて giant lysosome と呼ばれる巨大なリソソームが核の apical 側で発達しており(Clark, 1959; Knutton et al., 1974; Wissig and Graney, 1968)、細胞内に取り込んだ物質は最終的に、giant lysosome へ輸送され分解される(Fujita et al., 2007)。

エンドサイトーシスの制御因子として今回着目した Rab7 は後期エンドソーム-リソソーム間の膜動態を制御している。したがってこの研究では、エンドサイトーシスが活発で大きなリソソームが発達する小腸下部の小腸吸収上皮細胞に焦点を当て、Rab7 の機能解析を行った。この章では、P2 ctrl および cKO の小腸吸収上皮細胞の表現型を比較することで、乳児期の小腸吸収上皮細胞で活発なエンドサイトーシス経路の膜動態に対する Rab7 の機能について明らかにする。

結果

第1節 ctrl および cKO マウスの消化管の形態学的解析

P2 ctrl および cKO マウスの腸管の長さを比較した。実験方法はまず、消化管（胃から肛門まで）を摘出し、デジタルカメラで撮影した（図 2-2、a）。次に、写真上の腸管（幽門から肛門まで）の長さを Image J（National Institutes of Health, Bethesda）で測定し、両側 t 検定で 2 群間を比較した。その結果、 $p = 0.067$ であったため、P2 ctrl および cKO 間で腸管の長さに顕著な差はなかった（図 2-2、b）。

第2節 組織染色および電子顕微鏡を用いた形態学的解析

第1項 Hematoxylin & eosin (HE) 染色による組織学的解析

HE 染色を行った P2 マウスの回腸吸収上皮細胞のテクノビット切片を観察したところ、核の apical 側に supranuclear vesicles または apical vacuoles として知られている大きなリソソームが存在し(Clark, 1959; Knutton et al., 1974; Wissig and Graney, 1968)、リソソーム内はエオシンで染色された内容物で満たされていた（図 2-3、a-c）。一方、cKO 細胞における apical 側のコンパートメントは広範囲で空胞化を示した（図 2-3、d-f）。膨張した apical 側のコンパートメントのサイズはさまざまで、その内側にはほとんど膜小胞が蓄積していなかった（図 2-3、f）。Rab7 欠損小腸吸収上皮細胞の apical 側の細胞質は、この異常に大きな空胞で満たされていた。

第2項 透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope, TEM) を用いた組織学的解析

P2 回腸吸収上皮細胞における微細な細胞内構造は透過型電子顕微鏡で確認した（図 2-4）。ctrl 細胞においては、電子密度が高く膜で区切られた大きなオルガネラが核の apical 側に際立って存在した（図 2-4、a と e）。また、エンドサイトーシスコンパートメントの集合体である管状小胞ネットワークは微絨毛直下の apical 側細胞質に存在した（図 2-4、c の黄色矢印）。cKO 細胞では電子密度の高い apical vacuole が減少し、代わりに電子密度の低い膨張した空胞構造が細胞の apical 側に観

察された (図 2-4、b と f、g)。さらに、これまでの肉眼的所見で確認した ctrl および cKO のそれぞれの細胞に存在するオルガネラのサイズと電子密度については、Image J を用いて測定し比較解析を行った。まず、電子顕微鏡画像 (TIFF ファイル、8bit) 上の回腸吸収上皮細胞内におけるオルガネラの周囲を囲い (図 2-5、a)、オルガネラの面積 (Area) を算出した。電子密度については invert 機能により画像を白黒反転させた後、囲ったオルガネラの強度 (Mean) を 256 階調 (0-255) で濃淡を表現した。その結果、cKO 細胞における膨張した空胞は ctrl 腸細胞の大きな apical vacuole よりもサイズが大きく、電子密度が低いオルガネラであることを確認した (図 2-5、b と c)。以降、この空胞化した構造物は異常に大きな空胞と呼ぶ。cKO 細胞では apical 側の刷子縁直下における膜ネットワークのエンドソームも膨張していた (図 2-4、d の赤色矢印)。微絨毛構造の明確な違いは ctrl と cKO の間で観察されなかった (図 2-4、c と d)。

まとめ

P2 マウスの ctrl および cKO の腸管の長さに顕著な差はなかったが、小腸吸収上皮細胞の表現型は大きく異なっていた。P2 マウスの ctrl 小腸吸収上皮細胞では、核の apical 側に高電子密度の大きな apical vacuole (AV) が発達していた。一方、cKO 小腸吸収上皮細胞の細胞質内は、AV よりも大きく低電子密度の空胞で満たされていて、Rab7 がエンドサイトーシス経路に関するオルガネラのサイズや膜量を調節していることが分かった。

第3章 P2 ctrl および cKO 小腸吸収上皮細胞におけるエンドサイトーシス経路関連分子マーカーを用いた蛍光免疫染色

研究目的

P2 マウス小腸吸収上皮細胞では、核の apical 側に apical vacuole と呼ばれる大きなリソソーム様オルガネラが発達するため、エンドサイトーシスが活発であることが予想される。したがって、エンドサイトーシス経路に関連する分子マーカーの抗 SNX1 抗体（初期エンドソームのマーカー）、抗 Stx7 抗体（初期エンドソーム～リソソームのマーカー）、抗 Rab7 抗体（後期エンドソームのマーカー）、抗 Lamp2 抗体（リソソームのマーカー）を用いて蛍光免疫染色を行い、小腸吸収上皮細胞で生じる膜動態を分子レベルで解析する。同時に、cKO 小腸吸収上皮細胞のこれらのタンパク質の挙動も観察し、小腸吸収上皮細胞におけるエンドサイトーシス経路の膜動態に、Rab7 がどのように関与するのかを明らかにする。

結果

第1節 抗 SNX1 抗体、抗 Rab7 抗体、抗 Lamp2 抗体を用いた小腸 whole mount 蛍光免疫染色および cKO 小腸吸収上皮細胞との比較

P2 小腸吸収上皮細胞の SNX1、Rab7、Lamp2 の発現パターンを確認した（図 3-1）。ctrl 細胞においてはまず、apical vacuole がリソソームマーカーの Lamp2 に対して陽性であった。この結果は乳児の小腸吸収上皮細胞で形成される大きな apical vacuole がリソソームとの共通の特徴をもつという以前からの報告と一致した（図 3-1、a と b、e と f）。Rab7 のシグナルは、初期エンドソームマーカーである Sorting nexin1（SNX1）のシグナルとともに apical 側の領域に局在しており、両シグナルはやや重なっていたが（図 3-1、g と h の矢頭）、大半の Rab7 シグナルは SNX1 の発現領域と Lamp2 陽性 apical vacuole の間の細胞質に局在していた（図 3-1、e-h）。さらに Rab7 は Lamp2 陽性 apical vacuole にも局在していたが、Lamp2 とは異なり、apical vacuole の限界膜上にドット状に分布していた（図 3-1、f と g の矢印）。一方で、cKO 細胞では SNX1 における apical 側のシグナルが

ctrl 細胞で観察されたシグナルよりも大幅に減少した (図 3-1、c と d)。それぞれのタンパク質の発現量は小腸粘膜溶解液を用いたウエスタンブロット法で確認した (図 3-3)。cKO 細胞では SNX1 の発現量が減っているが、バンドの強度は非常に高かった (図 3-3、a)。Lamp2 の発現量は ctrl 細胞と大きな差はなかった (図 3-3、b)。

第 2 節 抗 Stx7 抗体、抗 Rab7 抗体、抗 Lamp2 抗体を用いた小腸 whole mount 蛍光免疫染色および cKO 小腸吸収上皮細胞との比較

P2 小腸吸収上皮細胞における Stx7、Rab7、Lamp2 の発現パターンを確認した (図 3-2)。ctrl 細胞ではまず、Rab7 と Lamp2 が第 1 節と同様に、染色されていた。Syntaxin7 (Stx7) は初期から後期エンドソームにかけて、さらにはリソソームを経由するエンドサイトーシスの膜輸送に関与しており、大半は apical 側に局在していたが、一部は Rab7 もしくは Lamp2 のシグナルと重なっていた (図 3-2、a と b、および e-h、矢印)。一方で、cKO 細胞では Stx7 のシグナルは apical 側で検出されたが、大きな空胞上には検出されなかった (図 3-2、c と d)。Rab7 欠損腸細胞の異常に大きな空胞においては初期エンドソームおよびリソソームマーカーに対して陰性であった。それぞれのタンパク質の発現量は小腸粘膜溶解液を用いたウエスタンブロット法で確認した (図 3-3)。cKO 細胞では Stx7 の発現量が減っているが、バンドの強度は非常に高かった (図 3-3、d)。

まとめ

P2 マウス小腸吸収上皮細胞では初期および後期エンドソームに局在するタンパク質が多く発現し、AV がリソソームの性質を持つことから、乳児期マウス小腸吸収上皮細胞ではエンドサイトーシスが活発であることが予測できた。一方、cKO 小腸吸収上皮細胞で観察された異常に大きな空胞の膜上では全てのマーカーのシグナルが検出限界以下となったが、タンパク質は細胞内で発現していた。初期エンドソームマーカー SNX1 の発現レベルが低かったのは、Rab7 の欠損で生じたオルガ

ネラの変化がエンドサイトーシス経路の初期のステップに影響を及ぼし、エンドサイトーシス経路が阻害されている可能性がある。

第4章 新生児期マウス ctrl および cKO 腸管を用いた uptake 実験

研究目的

新生児期小腸吸収上皮細胞はエンドサイトーシスを介して管腔側から栄養を取りこむ。乳児期ラット小腸では、液相エンドサイトーシスのトレーサーである HRP を用いた *in vivo* の取り込み実験から、小腸近位から遠位にかけて全ての小腸吸収上皮細胞 apical 側で液相エンドサイトーシスが行われており、特に小腸下部では取り込まれた高分子物質が最終的に巨大なリソソームに輸送される様子が確認されている(Baba et al., 2002; Fujita et al., 2007)。一方、*in vitro* の取り込み実験は行われておらず、その適切な培養条件は分かっていない。そこで、すでに培養条件が構築された E6.5 マウス胚の蛍光 dextran 取り込みの系 (uptake 実験) (Kawamura et al., 2012)を参考に、小腸組織を用いた *in vitro* uptake アッセイを行い、P2 マウス小腸吸収上皮細胞のエンドサイトーシスが *in vitro* の条件下でどのような膜動態を示すのかを明らかにする。さらに第3章の結果より SNX1 の発現レベルが低かった cKO と比較し、Rab7 がエンドサイトーシス活性に影響を与えるのかを明らかにする。

結果

第1節 腸管試料を用いた *in vitro* uptake アッセイの説明

まず、P2 マウスより摘出した小腸下部組織を L-glutamine および sodium pyruvate を含む DMEM 内へ移した後、幅 1-2mm の組織片を縦方向に展開した。この組織片は 50% ラット血清を含む DMEM (Culture Medium, CM) 内へ移し、30 分間インキュベートした。組織の損傷を回避し鮮度を保つため、解剖から CM 内への移動は数分で終わった。次に、uptake 実験に移った。uptake 実験のタイムコースは、マウス E6.5 胚 uptake 実験における VE 細胞内膜動態の経時的な観察結果を参考にした (Kawamura et al., 2012)。この実験ではまず、胚が rhodamine - dextran (RD) で 15 分間標識された後、蛍光 dextran 非存在下の CM 内で 15 分間インキュベートされている。この時点で、ほとんどの RD が apical vacuole (AV) へ移動したことが確認されている。その後、さらに胚が FITC dextran (FD) で 5 分間標識され、最後に蛍光 dextran 非存在下の CM 内で 0~30 分間インキュベートされている。

インキュベート後すぐの VE 細胞 (0 分) では、apical 側の細胞表面付近に FD で標識されたエンドソームが現れ RD で標識された AV に付着していたが、赤と緑のシグナルは完全に分離していることが観察されている。続いて、FD 標識後の 5 分から 15 分以内で球状の FD で標識されたエンドソームが RD で標識された AV の表面を取り囲んでいた。さらに FD で標識後の 15 分から 30 分間に赤と緑のシグナルが混合し、AV が黄色くなっていることが確認されている。したがって、FD 標識後の膜動態に大きな変化があった 0 分、15 分、30 分の 3 点をチェイス時間に設定し、図 4-1 で示すように P2 腸管を用いた uptake 実験を行った。各々の工程でインキュベートした時の条件は、5% CO₂、95% air、37°C であった。チェイス終了後は腸組織を 4% PFA で一晩固定した。この培養実験ではすべての絨毛で一様に蛍光 dextran の取り込みが観察できるよう、インキュベートする前には必ず培養液と組織をよく混ぜた。

第 2 節 P2 ctrl および cKO 腸管試料を用いた *in vitro* uptake アッセイ

腸管試料は whole mount で観察した。P2 マウス ctrl 腸の観察結果についてはまず、RD チェイスインキュベーション後、取り込まれた RD の大半は apical vacuole へ輸送された (図 4-2、a)。FD 標識後すぐの腸管では (図 4-2、a と d)、FD シグナルは apical 側細胞の表面近くの細胞質で観察されたが (図 4-2、a の 0 分)、一方で RD が apical vacuole に到着したため、緑と赤のシグナルは十分に分離されていた。続いて FD 標識後 15 分以内で、apical 側の FD シグナルが球状になった (図 4-2、b と e)。さらに二回目の標識の後 15 分から 30 分間で、赤 (RD) と緑 (FD) のシグナルが混合し、apical vacuole が黄色くなった (図 4-2、b と e、c と f)。これらの観察結果はエンドサイトーシスされた物質が最初に管状小胞ネットワークに蓄積し、~15 分以内で球状コンパートメント内に、それから~30 分までの間に apical vacuole へ運ばれたことを示し、P2 マウス小腸吸収上皮細胞においてもマウス E6.5 胚 VE 細胞とほとんど同様の膜動態を示すことを確認した。ctrl 新生児腸組織における取り込み実験と比較して、Rab7 欠損腸細胞では、かすかな蛍光シグナルを apical 側細

胞膜と異常に大きな空胞の間で観察した (図 4-2、g-l)。したがって P2 Rab7 欠損小腸において、エンドサイトーシスによる取り込み活性が低下したことを示した。

まとめ

P2 ctrl 小腸吸収上皮細胞ではエンドサイトーシスによる取り込みが活発で、細胞内に取り込まれた高分子物質は小胞輸送を介して最終的に AV へ輸送されることが分かった。cKO 小腸吸収上皮細胞では ctrl よりも取り込み量が顕著に低下し、Rab7 がエンドサイトーシス活性に影響を与えることが分かった。

第5章 Rab7 欠損 VE 細胞および Rab7 欠損小腸吸収上皮細胞の表現型の違いについて

研究目的

Rab7 の欠損は乳児期小腸吸収上皮細胞および VE 細胞の間で異なる表現型を生じた。まず、乳児小腸吸収上皮細胞では大きな空胞の形成が観察された (図 1-6, d と 2-3, d-f)。一方で、VE 細胞では apical vacuole (AV) の断片化が観察された(Kawamura et al., 2012)。したがって、異なる細胞で観察された Rab7 欠損による空胞のサイズの違いがどのように生じるのかという疑問点がある。空胞の肥大化はエンドサイトーシス経路の初期段階のステップに重要なホスファチジルイノシトール 3,5-ニリン酸 [PtdIns (3,5) P₂] の合成酵素であるホスファチジルイノシトール 3-リン酸 5-キナーゼの欠損胚の VE 細胞でも観察されている(Takasuga et al., 2013)。

P2 cKO 小腸の絨毛全体、基底部から先端部までを観察すると、先端部に発達する異常に大きな空胞のサイズが絨毛基底部周辺の小胞サイズよりも大きいことが分かった (図 2-3, d)。この観察結果から、私は以下のことを推察した。すなわち、絨毛基底部に近い、増殖幹細胞から分化した若い小腸吸収上皮細胞は比較的小さな小胞を持つ形態を示すが、絨毛の先端部の成熟した細胞は、大きな空胞を持つようになるのではないのかと考えた。そこでこの仮説を明らかにするため、まず、電子顕微鏡法を用いて絨毛基底部、基底部周辺、先端部の小腸吸収上皮細胞の細胞内小胞の大きさを測定し、比較する。さらに、巨大なリソソームが形成される前の出生直前の 18.5dpc 小腸吸収上皮細胞(Wilson JM, 1991)と cKO 小腸吸収上皮細胞の形態も比較し、巨大な空胞がどのタイミングで形成されているのかを明らかにする。

結果

第1節 P2 ctrl および cKO 絨毛基底部分、基底部分、先端部の小腸吸収上皮細胞に存在するオルガネラサイズの比較

絨毛基底部分の Rab7 cKO 小腸吸収上皮細胞には ctrl 小腸吸収上皮細胞に似たような小さな小胞 (図 5-1a3、a6) を蓄積した (図 5-1b3、b6)。これらの小胞の平均サイズは cKO および ctrl 腸細胞でそれぞれ、 $0.117 \mu\text{m}^2$ および $0.080 \mu\text{m}^2$ を示した (図 5-2“bottom”、右パネル)。絨毛基底部分付近の領域では、小胞のサイズがより大きくなったが、cKO と control 小腸吸収上皮細胞では顕著な差がなかった (図 5-2“Near the bottom”、中央パネル)。それに比べ、cKO 細胞では平均 $30.95 \mu\text{m}^2$ を占める巨大空胞 ($>1 \mu\text{m}^2$) が先端の周辺で現れた (図 5-1b1 と b4)。一方で、ctrl 小腸吸収上皮細胞における大きな apical vacuole ($>1 \mu\text{m}^2$) のサイズは平均 $7.67 \mu\text{m}^2$ であったが (図 5-1a1 と a4)、cKO 小腸吸収上皮細胞の異常に大きな空胞よりかなり小さかった (図 5-2 “Tip”、左パネル、図 2-5、c も参照)。

第2節 出生直前 (18.5 dpc) の ctrl および cKO 小腸吸収上皮細胞の hematoxylin & eosin 染色による形態解析

ラット小腸吸収上皮細胞における大きな apical vacuole は giant lysosome とも呼ばれており、誕生後に形成されることが報告されている (Wilson JM, 1991)。この報告に矛盾なく、18.5 dpc マウス (出産の前日) の ctrl 胎児期腸細胞では大きな apical vacuole がなかった (図 5-3、a-c)。同じ発達段階の cKO 胎児期 (図 5-3、d-f) および ctrl 胎児期小腸吸収上皮細胞 (図 5-3、a-c) の間で apical 側のコンパートメントの形態に顕著な差は観察されなかった。それゆえ、apical 側コンパートメントの肥大化 (図 2-3、d-f) は誕生後に生じ、異常に大きな空胞の深刻な空胞化はエンドサイトーシスのトラフィッキング欠陥が原因で出生後に生じることが示唆された。

第3節 出生直前 (18.5 dpc) の ctrl および cKO 腸管試料を用いた *in vitro uptake* アッセイ

異常に大きな空胞の深刻な肥大化は乳児期の cKO 小腸吸収上皮細胞を埋め尽くし、エンドサイトーシス経路を物理的に阻害している可能性がある。したがって、大きな空胞が形成される前の 18.5 dpc cKO 小腸組織を用いて *in vitro uptake* アッセイを行い、cKO 小腸吸収上皮細胞で生じる詳細なエンドサイトーシス経路の膜動態を観察した。

まず、AV が発達する前の 18.5 dpc 小腸吸収上皮細胞のエンドサイトーシス活性を調査した。ctrl および cKO の両方の胎児期小腸吸収上皮細胞で FD が取り込まれたため、Rab7 が欠損してもエンドサイトーシス最初のステップに問題がないことが分かった (図 5-4)。ctrl 小腸吸収上皮細胞では FD と RD のシグナルは次第に混ざった (図 5-4, a-f)。一方、cKO 細胞ではチェイス 30 分後でも、色素を含むオルガネラは空間的に断片化したままとなった (図 5-4, i と l)。この結果は、Rab7 がエンドサイトーシス経路の後期段階である巨大リソソームの形成に必要であることが分かった。エンドサイトーシスの膜動態を調査するトレーサーの混合不良、および色素含有オルガネラが断片化した形態から、Rab7 欠損吸収上皮細胞は Rab7 欠損 VE 細胞で示された表現型と似ていた。

この実験操作について、今まで小腸の損傷を懸念し、物理的な負荷を極力減らして操作した。具体的には、腸管を移した培養液の入ったディッシュは、インキュベーション中は静置していた。しかし、P2 や 18.5 dpc の小腸は培養液中で優しく混合しても問題がないことが分かり、今回はインキュベーション中に組織と培養液を何度かシェイクした。すると、18.5 dpc cKO 腸管ではオルガネラの断片化が観察された一方で、インキュベーション中に組織と培養液を何度かシェイクを行わなかったときには観察されなかった緑のオルガネラと赤のオルガネラが非常に近接したやや大きめのオルガネラも観察された。この現象についての詳細な解析は今後の課題となるが、私はオルガネラ同士が融合している可能性があると考えた。したがって、cKO 腸管では栄養の供給量が少ないとオルガネラが断片化したような現象を示し、栄養の供給量が多いと、Rab7 依存のエンドサイトーシス経路とは別の栄養供給に関する機構が存在すると考えられる。こちらの参考文献(Randall et al.,

2011)には、シェーカーで常に揺らしながら小腸を培養する方法が記載されており、今後は P2 も含めて培養液で小腸をインキュベートする際は常に揺らす必要があると考えられる。

まとめ

P2 cKO 小腸吸収上皮細胞で観察された異常に大きな空胞は、細胞の成長により巨大な空胞を形成すること、また出生後の小腸吸収上皮細胞で形成されることがわかった。また、巨大な空胞が形成される前の cKO 細胞では、細胞外の物質が細胞内に取り込まれていたが、オルガネラのサイズや融合プロセスに変化を生じた。

第6章 乳児期 Rab7 欠損マウスにおける成長遅延

研究目的

cKO マウスの小腸吸収上皮細胞におけるエンドサイトーシスの欠陥は栄養失調を引き起こし、その結果、成長に影響を及ぼすことが予想される。そこで、cKO マウスの出生直前 (E18.5) および生後 (P1) から離乳 (P21) までの体重測定を行い、ctrl マウスと比較することで、生育に影響するのかを明らかにする。

結果

第1節 ctrl および cKO マウスの母乳の摂食行動の確認

まず、P2 cKO マウスの摂食状況が正常であるかを確認するため、母乳摂取中の ctrl および cKO マウスの摂食行動を確認し、胃の中の母乳の貯留の程度を観察した。cKO マウスは ctrl マウスと同様に摂食行動に問題がなく、胃は同腹仔内で同程度のミルクで満たされていた。したがって、cKO マウスにおけるミルクの摂取は正常であった (図 6-1)。

第2節 出生直前から離乳までの ctrl および cKO マウスの体重測定

ctrl と cKO マウスの体重差について、まず E18.5 では雌雄ともに有意な差が認められなかった (図 6-2 もしくは 6-3)。しかし、出生後の cKO マウスの体重は比較的小さく、この体重差は雄では P1 から P14 まで (図 6-2)、雌では P1 から P8 まで維持された (図 6-3)。cKO マウスは腸吸収上皮細胞におけるエンドサイトーシス活性が低下したにもかかわらず、母乳からむしろ十分な栄養を吸収し、ctrl マウスより低速度で成長を持続する可能性がある。

まとめ

P2 ctrl および cKO マウスはどちらも、摂食行動に問題はなかったが、cKO マウスは雌雄ともに成長遅延の傾向を示した。

考察

小腸での消化機構はヒトを含む哺乳動物の離乳の前後で異なることが知られている(Henning, 1985; Poquet and Wooster, 2016)。成人では、消化管管腔の細胞外加水分解酵素が摂取したタンパク質や炭水化物の重合体を消化し、生じたアミノ酸や低分子量の炭水化物は特異的なトランスポーターを介して腸吸収上皮細胞に吸収される(Louvard D, 1992; Pacha, 2000)。一方で乳児期では、母乳中のタンパク質が小腸管腔で分解されないまま小腸に届き、エンドサイトーシスを介して腸吸収上皮細胞に取り込まれ消化される(Baintner, 2007)。げっ歯類では、周産期の腸吸収上皮細胞は特殊な apical 側のエンドサイトーシス複合体を形成し、離乳まで維持される。apical 側のエンドサイトーシス複合体は apical 側の細胞膜に隣接した管状および小胞エンドソームを含み、それから supranuclear vesicles もしくは giant vacuoles として知られている大きな vacuole が apical 側の細胞質を占める(Clark, 1959; Knutton et al., 1974; Wissig and Graney, 1968)。形態的および組織学的研究ではこれらの vacuole は、消化酵素の存在、エンドサイトーシスマーカーや酸性内容物の蓄積といったリソソームとの共通の特徴を共有する(Baintner, 1994; Fujita M, 1990; Gonnella and Neutra, 1984; Ichimura et al., 1994)。

初期胚の臓側内胚葉および乳幼児の小腸は、エンドサイトーシス経路において、共通した特徴を示す。すなわち、両者とも非常に大きなリソソームコンパートメントを有する。しかし、Rab7 欠損による表現型は大きく異なる。Rab7 欠損臓側内胚葉では大きな apical vacuole が存在せず、代わりに小さなエンドソーム様小胞が細胞質を満たす(Kawamura et al., 2012)。一方で、乳幼児小腸では、Rab7 欠損条件下で異常に大きな空胞が発達した。新生児の変異型の腸では intervillus pocket の近くに位置する腸吸収上皮細胞に異常に大きな空胞が観察されなかった。この観察は Rab7 機能の喪失による最初の影響が初期胚臓側内胚葉で観察された大きな apical vacuole が断片化するという知見と一致した。臓側内胚葉では、apical vacuole の形成が E5.5~5.7 で始まり、apical vacuole は 1 日以内の E6.2~6.7 で現れる。生まれたばかりの腸吸収上皮細胞の半減期は 5 日以上であると推定されている(Muncan et al., 2011)。したがって、絨毛末端に位置する腸吸収上皮細胞は Rab7 欠損胚を用いた研究(Kawamura et al., 2012)で示した臓側内胚葉よりも長く Rab7 が欠損状態であった。すなわち、

腸吸収上皮細胞の表現型は、特に絨毛末端部で位置する細胞で観察された巨大な空胞は、長時間の Rab7 欠損による影響と考えられる。Rab7 欠損は初期的取り込みを含む小胞輸送経路のあらゆるステップで“traffic jam”を引き起こし、その結果、取り込み障害や空胞の肥大化などの終末的な形態を示した。この老いた腸吸収上皮細胞の表現型とは対照的に、胎児の腸吸収上皮細胞では臓側内胚葉のような Rab7 機能欠損の際の初期的な欠陥を示した。

Trpm1 と Trpm3 遺伝子にコードされている mucolipin-1 と-3 は乳児の小腸吸収上皮細胞に発現するカチオンチャンネルである。小腸吸収上皮細胞の Trpm1 と Trpm3 のダブルノックアウト (mucolipin dKO) は乳児期では、Rab7 欠損小腸吸収上皮細胞と同様に大きな空胞が形成される (Remis et al., 2014)。mucolipin dKO 細胞の巨大な空胞には初期エンドソームのマーカーである EEA1 が蓄積する。この巨大な空胞の発達は PIPKIII 欠損細胞でも報告されている (Takasuga et al., 2013)。酵母のオルソログである Fab1 は、分裂を促進し融合を阻害することで、液胞のサイズを維持するのに重要である (Yamamoto et al., 1995)。様々な文献から PtdIns(3,5)P₂ は mucolipin の正の制御因子で、mucolipin の酵母のホモログが Yvc1 であることが報告されている (Dong et al., 2010; Miner et al., 2019)。カルシウム透過型カチオンチャンネル mucolipin-1 は PtdIns(3,5)P₂ の存在下で直接的に活性化され、Ca²⁺の流出を可能にする (Dong et al., 2010)。Ca²⁺はエンドリソソームからリソソームへの再構成と同様に、後期エンドソームの同型もしくはリソソーム/液胞との異型融合の重要な制御機能を持つことが知られている (Luzio et al., 2007a)。したがって、エンドソーム膜への PtdIns(3,5)P₂ の局所的な産生は限定的な領域でのチャンネルの活性を制御し、おそらく時間空間的に後期エンドソームの融合と分裂の制御ができる可能性がある。Rab GTPase は PtdIns 変換にも関与し、エンドソームの成熟や選別におけるエンドソームの膜動態にも重要な役割を果たす。WDR91 (Rab7 のエフェクター) の欠損はエンドソームの PtdIns3P を増加させ、その結果、エンドサイトーシスに関連する巨大なコンパートメントを蓄積し、リソソームへの輸送障害が起こる (Liu et al., 2017)。したがって、Rab5/Rab7 置換の調節と PIPKIII-mucolipin 軸の PtdIns3P のダウンレギュレーションはエンドサイトーシスに関連するコンパートメントのアセンブリに対して保存された制御システムである。PtdIns の制御機構の不完

全性は小胞輸送に関連する PtdIns 結合分子の局在に影響を及ぼす可能性がある。したがって、Rab7 cKO 小腸吸収上皮細胞で大きな空胞化を示したという表現型は、部分的に浸透圧性の膨張やエンドソームのイオンチャネルの調節不良によって引き起こされた無秩序な融合と分裂の結果であると考えられる。

mucolipin dKO の小腸吸収上皮細胞は vacuole が欠失し、さらに乳児期の成長遅延も示すため、エンドサイトーシス経路と vacuole のアセンブリが発育に直接関与していることを示唆する。しかしながら、mucolipin 欠損と Rab7 欠損で示す表現型は空胞の肥大化と共通しているにもかかわらず、mucolipin 変異型マウスは Rab7 よりも深刻な成長遅延と死亡率の増加を示している(Remis et al., 2014)。この結果について私は、Rab7 欠損により絨毛先端の小腸吸収上皮細胞で形成された巨大な空胞が終末的な結果を反映していると考えている。なぜなら細胞の増殖が活発な intervillus pocket に位置するほとんどの若い細胞には巨大な空胞がなく、正常な形態を示すため、それらがまだエンドサイトーシスが活発であり、新生児の栄養を維持していると考えられる。さらに、胎児期の Rab7 欠損小腸吸収上皮細胞ではサイズは小さいが AV のようなオルガネラや、オルガネラ同士の融合が部分的に観察されたことから、Rab7 非存在下でもエンドサイトーシス経路が進行するような代償機構や環境に依存した条件が存在する可能性があると考えられる。

Rab7 は病原菌の標的である。たとえば、salmonella enterica serovar Typhimurium は腸吸収上皮細胞に感染し Rab7 陽性エンドサイトーシスコンパートメントの中に入ることで、およびインターロイキン 22 が誘導する Rab7 アップレギュレーションが細菌の排除に関与すると考えられている(Forbester et al., 2018)。Rab7 は salmonella を含む空胞の形成に重要な制御因子で、空胞内では細菌が増殖するため、Rab7 は細菌感染と密接に関与する(D'Costa et al., 2015; Mohapatra et al., 2019)。Mycobacterium avium は選択的に腸上皮細胞に感染する。乳幼児は細菌感染への感受性がより高い。それゆえ、腸特異的 Rab7 欠損変異型マウスは微生物感染への感受性が増強し、さらに自然環境下での栄養の取り込みの低減を示す可能性がある。

実験材料と方法

1. 実験動物

全ての動物実験は同志社女子大学研究倫理委員会により承認され、組織的および国際的なガイドラインに従って実験操作を行った。C57Bl/6 および ICR マウスは SLC Japan（静岡, 日本）から購入した。Villin-Cre マウス (Jackson Laboratory) は *Rab7^{flx/flx}; Gt (ROSA) 26 Sor^{tm1Sho}* と交配し、*Rab7^{flx/flx}; Gt (ROSA) 26 Sor^{tm1Sho}; Villin-Cre* マウスを得た。すべてのマウスは 12 時間照明 (明期 8:00-20:00、暗期 20:00-8:00) で管理され、餌および水を自由に摂取できるように供給した。本研究では *Rab7^{flx/flx}; Gt (ROSA) 26 Sor^{tm1Sho}* をコントロール (ctrl) マウス、*Rab7^{flx/flx}; Gt (ROSA) 26 Sor^{tm1Sho}; VilCre^{Tg/+}* をコンディショナルノックアウト (cKO) マウスとして使用した。

2. 腸組織を用いた遺伝子型解析

2. 1. PCR 用腸溶解液の作製

形態学的な観察を終えた小腸のサンプルはリン酸緩衝液 (137mM NaCl, 8.10mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, 2.68mM KCl, 1.47mM KH₂PO₄) または PBS-T (0.05% (w/v) Tween20 を含むリン酸緩衝液) で洗浄し、Tris-EDTA 緩衝液 (pH8.0) に数秒間浸け置いた後、QuickExtract™ DNA Extraction Solution (Epicentre) 40-80 μl を分注した 0.2ml PCR シングルチューブへ移した。その後、55 °C で 90 分間のインキュベートで腸組織を溶解し、95 °C で 15 分間の加熱による不活化を行ったことで、DNA テンプレートとして PCR に用いるための腸溶解液を作製した。PCR を行うまでは、4°C で保存した。

2. 2. PCR 法およびアガロースゲル電気泳動法による PCR 産物の検出

PCR は TaKaRa Ex Taq® (Mg²⁺ free Buffer) (Takara) に添付の試薬とプライマーを含む反応液 48 ul (組成は下記に記す) および 2. 1. で作製した腸溶解液 2 ul を加えて行い、各々の遺伝子型を判別した。プライマーは株式会社北海道システム・サイエンスまたは株式会社エキシジェンで合成した。プライマーセットおよび配列は表 2、表 3 に示す。PCR は下記の通りの反応条件で行った。

【PCR 反応液組成】

10×ExTaq buffer (Mg ²⁺ free)	5.0 μl
2.5mM dNTPs	4.0 μl
25mM MgCl ₂	3.0 μl
ExTaq Polymerase	0.25 μl
sense primer (100μM)	0.25 μl
antisense primer (100μM)	0.25 μl
蒸留水	35.25 μl
Total	48 μl

【*Cre* 遺伝子アリル、*Rab7^{flax}* アリル、*Rab7* アリル】

95 °C, 2 min-[-95 °C, 10 sec-70 °C >>>62 °C, 10 sec(Δ1 °C /cycle)-72 °C, 1 min-]⁹
-[-94 °C, 10 sec-62 °C, 10 sec-72 °C, 1 min-]²⁵-72 °C, 5 min-4 °C, ∞

【*Gt (ROSA) 26Sor^{tmlSho}* 遺伝子アリル】

95 °C, 3 min-[-95 °C, 10 sec-70 °C >>>60 °C, 10 sec(Δ1 °C /cycle)-72 °C, 1.25 min-]¹¹
-[-94 °C, 10 sec-60 °C, 10 sec-72 °C, 1.25 min-]²⁵-72 °C, 5 min-4 °C, ∞

【*Zfy1* 遺伝子アリル】

95 °C, 2 min-[-95 °C, 10 sec-70 °C >>>61 °C, 10 sec(Δ1 °C /cycle)-72 °C, 30 sec-]¹⁰
-[-94 °C, 10 sec-61 °C, 10 sec-72 °C, 30 sec-]²⁵-72 °C, 5 min-4 °C, ∞

PCR 反応後、反応液 10μl に 10×loading buffer (0.05% xylene cyanol, 0.05% bromophenol blue, 1mM ethylenediaminetetraacetic acid (pH8.0) 、30% glycerol) を 2μl 添加して、100 bp DNA ladder (Bioneer,

D1030) とともに 1.5% アガロースゲル (1.5% アガロース、TAE バッファー、100 ng/ml 臭化エチジウム) を用いて電気泳動を行った。電気泳動は泳動用緩衝液 (0.5×TAE, 200 ng/ml 臭化エチジウム) を用いて、定電圧モード 100V で 30 分間行った。電気泳動終了後、UV 照射により PCR 産物を検出した。

3. 組織学的解析

3. 1. 1. 腸のテクノビット標本作製および切片作製

断頭により安楽死させた新生児マウス (P2) もしくは胎児マウス (E18.5) から小腸を摘出した後、リン酸緩衝液内で小腸の中央より下部の部位を 3-5 mm に断片化し、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (4% PFA) に浸して一晩 4°C で固定した。固定された小腸組織を 4°C のリン酸緩衝液で洗浄後、50%、75%、87.5%、93.75% エタノール/リン酸緩衝液で 1 時間毎に順次濃度を上げて室温で脱水し、その後 100% エタノールに室温で 1 時間脱水し、さらに新しい 100% エタノールに浸して 4°C で一晩脱水した。翌日、常温硬化樹脂である Technovit 7100 (Kulzer) 液に置換するため、50%、75%、87.5%、93.75% Technovit 液/リン酸緩衝液に 2 時間毎に順次濃度を上げて室温で浸け置き、最後に 100% Technovit に浸して 4°C で一晩浸漬した。最終的に Technovit 7100 液と Technovit 7100 硬化剤を 40:1 の割合で混ぜた溶液を用いて包埋し、Technovit 3040 の粉末と Universal liquid 液

(Technovit 3040 に対する体積比、2 : 1) を混ぜた接着剤でヒストブロックに固定することで、試料ブロックを作製した。切片は回転式マイクローム (Leica, ライカ RM2255) を用いて、試料表面を温かい息で湿らせてから厚さ 3~4µm になるように切り出し、蒸留水の上に浮かべて水上で伸展させた。その後、切片はスライドガラス (松浪, MAS-01) ですくいとり、スライドガラスに定着させて 42°C の伸展機で乾燥させた。

3. 1. 2. ヘマトキシリン・エオジン染色、封入および観察

切片が貼り付いたスライドを染色かごに入れ、Hematoxylin 溶液で 30 分間染色後、5 分間流水で

洗浄した。さらに Eosin 溶液で 30 秒間染色し、流水で 5 分間洗浄した。染色された切片が貼り付いたスライドを 42°C の伸展機で乾燥させたあと、封入剤 (ORSAtec) とカバーガラス (松浪) を用いて永久プレパラートを作製した。染色された切片は顕微鏡 (OLYMPUS BX50) で撮影され、画像は QImaging MicroPublisher 5.0 RTV (Teledyne Photometrics) により取得した。

3. 2. 腸の透過型電子顕微鏡標本の作製および観察

電子顕微鏡観察は株式会社 東海電子顕微鏡解析 (株) に解析を依頼した。具体的にはまず、摘出した新生児マウス (P2) の小腸を 0.1M リン酸緩衝液に 2% PFA および 2% グルタルアルデヒドを含んだ固定液に浸し、4°C で一晩固定した。固定したサンプルはその後、東海電子顕微鏡解析 (株) で洗浄され、2% 四酸化オスミウム溶液で 2 時間後固定され、樹脂に包埋された。この切片は厚さ 70 nm で切り出され、酢酸ウラン染色液と鉛染色液 (Sigma-Aldrich) で染色された。染色された切片は JEM-1400 Plus electron microscope (株式会社日本電子) にて撮影され、画像は CCD カメラ (株式会社オリンパス) で取得された。

4. ホールマウント (Whole mount) 小腸の蛍光免疫染色

新生児マウス (P2) は断頭により安楽死させ、摘出した小腸を氷冷したリン酸緩衝液 (PBS) 内に移し、腸間膜結合組織および脂肪組織をピンセットで取り除いた。小腸は中央より下部の部位を解剖用ハサミで 1-2mm の長さになるように切断し、得られた腸組織の断片をヴァンナス型剪刀で縦方向に展開した (図 i)。管腔側が剥き出しになった腸管を PBS で洗浄し、すぐに 4% PFA に浸して 4°C で一晩固定した。固定した小腸は PBS で洗浄した後、10mM Glycine/PBS に室温で 10 分間浸け置くことでパラホルムアルデヒドをクエンチングし、再度 PBS で洗浄した。次に、0.5% Triton-X 100/PBS 中で 20 分間、室温で透過処理を行い、その後、0.5% Triton-X 100、0.5% TSA ブロッキング試薬 (PerkinElmer)、1% 正常ロバ血清、0.05% Tween20 および 0.01% アジ化ナトリウムを含む PBS (ブロッキング液) へ移して、4°C で一晩振盪しながらブロッキング処理を行った。続いて 1

次抗体を含むブロッキング液の中で4°Cにて一晩振盪しながら浸け置いた。その後、PBS-T (0.05% (w/v) Tween20 を含む PBS) で洗浄し (20min x 6)、遮光条件下で、2次抗体を含むブロッキング液の中で4°Cにて一晩振盪しながら浸け置いた。ラベルされた小腸は、遮光条件下で、PBS-T で洗浄後 (20min x 6)、4% PFA 内で室温にて 20 分間浸け置き、再度 PBS-T で洗浄した (20min x 6)。最後に遮光条件下で、20%Glycerol/PBS-T、40%Glycerol/PBS-T へ室温にて 10 分間ずつ順次浸け置き、DAPI を含む VECTASHIED (Vector Laboratories) を 4°Cで一晩マウントした。観察は共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM800, Oberkochen, Germany) を用いることで可視化した。撮影時はラベルした腸管をガラスベースディッシュ (IWAKI, 3910-035) の上に置き、DAPI を含む VECTASHIED をマウントした後、18mm x 18mm のカバーガラス (松浪) をかぶせて観察した (図ii)。用いた一次抗体について、アフィニティー精製したウサギ抗 Sorting nexin 1 (SNX1) 抗体(Nakamura et al., 2001) および抗 Syntaxin 7 (Stx7) 抗体(Nakamura et al., 2000)はそれぞれ、2.4 および 4.1 μ g/ml になるようにブロッキング液で希釈された。抗 Rab7 モノクローナル抗体 (チキン クローン OA561) は 6.9 μ g/ml で使用した(Aoyama et al., 2012; Kawamura et al., 2012)。抗 Lamp2 モノクローナル抗体 (ラット クローン GL2A7) は Developmental Study Hybridoma Bank から入手し、4.4 μ g/ml で使用した。フルオレセイン-、Cy3-および Cy5-結合二次抗体は Jackson ImmunoResearch から入手し、製造元の推奨に従ってグリセロールが 50%になるように添加し、それぞれブロッキング液に 1:100、1:500 および 1:250 の希釈倍率で溶かして使用した。

5. 腸管の whole mount を用いた X-gal 染色アッセイ

5. 1. 胎児マウス (18.5dpc) の摘出

妊娠 18.5 日目 (18.5dpc) の妊娠マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、開腹した。次に子宮頸部、子宮広間膜および卵巣周辺を切除し、子宮を摘出した。さらに摘出した子宮の胎盤周辺の子宮組織や羊膜を、胎児を傷つけないようにピンセットで破り取り、胎児を摘出した。取り出した胎児は、臍帯を切除した後、口周辺の羊水を入念にふき取り、皮膚を優しくつまんで肺呼吸を誘発させた。

5. 2. Whole mount 小腸を用いた X-gal 染色アッセイ

胎児マウス (18.5dpc) は断頭により安楽死させ、摘出した小腸を PBS 内に移し、腸間膜結合組織および脂肪組織をピンセットで取り除いた。小腸は中央より下部の部位を解剖用ハサミで 1-2mm の長さになるように切断し、得られた腸組織の断片をヴァンナス型剪刀で縦方向に展開した (図i)。管腔側が剥き出しになった腸管を PBS で洗浄し、室温で 20 分間、4% PFA を用いて固定した。その後、PBS で洗浄し、1mg/ml X-gal 染色液 (ジメチルホルムアミド (wako, 045-02916) に溶解した 20mg/ml X-gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド) (wako, 027-07854) を Beta - Galactosidase Staining Kit (Mirus Bio, MIR2600) の β-Gal Staining Solution で希釈) へ腸管を移し、37°C で 2 時間、遮光しながらインキュベートした。途中、20 - 40 mM Tris-HCl (pH7.3) を含む 16.3 mg/ml X-gal 染色液に移し替えた。染色後は PBS で洗浄し、4% PFA で一晩以上、4°C で固定した。染色された whole mount 小腸は顕微鏡 (Leica M205 C) で撮影し、画像は QImaging MicroPublisher 5.0 RTV (Teledyne Photometrics) により取得した。撮影時は染色した腸管を、PBS を加えたディッシュ (IWAKI, 1000-035) の中に置き、観察した。

6. 腸管試料を用いた *in vitro* uptake アッセイ

新生児マウス (P2) は断頭により安楽死させ、摘出した小腸は 2mM L-glutamine (Thermo Fisher Scientific, 25030149)、1mM sodium pyruvate (Thermo Fisher Scientific, 11360070)、4.5g/L glucose、3.7g/L sodium bicarbonate を含む DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium (SIGMA, D5030-1L) 内に移した。腸管は DMEM 内で小腸の中央より下部の部位を 2-3mm の長さになるように切断し、眼科用ハサミで縦方向に展開した (図i)。剥き出しになった腸管管腔は DMEM で洗浄し内容物を取り除いた。腸組織は DMEM およびラット血清が 1:1 の割合で含まれる培養液 (Culture Medium, CM) 中へ移し、5% CO₂ および 95% 空気下で 37°C、30 分間インキュベートした。次に、腸組織は 2mg/ml tetramethylrhodamine-dextran (70,000MW, lysine-fixable, Thermo Fisher Scientific) を含む培養液内で 15 分間インキュベートした。その後 DMEM で洗浄し CM 内で 15 分間チェイスした。さらに 2mg/ml

FITC-dextran (70,000MW, lysine-fixable, Thermo Fisher Scientific) を含む培養液内で5分間インキュベートし、DMEMで洗浄後、0分、15分、30分CM内でインキュベートした。最終的な標識およびチェイスが終了した後、腸組織は4% PFA/PBS内へ移し、4°Cで一晩固定した。インキュベーターは5% CO₂ および95%空気下かつ37°Cに設定したミニCO₂インキュベーター (Asahi, 4020型) を用いた。培養液はすべて実験当日に調製し、解剖前にインキュベーター内で1時間以上保存してから使用した。翌日、20% Glycerol/PBS-T、40% Glycerol/PBS-Tへ10分間ずつ室温で順次浸しグリセロール置換を行った後、DAPIを含むVECTASHIED (Vector Laboratories) でマウントし、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM800, Oberkochen, Germany) で可視化した。撮影時はラベルした腸管をガラスベースディッシュ (IWAKI, 3910-035) の上に置き、DAPIを含むVECTASHIEDをマウントした後、18mm x 18mmのカバーガラス (松浪) をかぶせて観察した (図ii)。

7. 免疫ブロッティング

7. 1. 小腸ライゼートの調製

P2マウスの小腸断片は管腔サイドをむき出しにするためヴァンナス型剪刀を使って縦方向に展開され (図i)、腸絨毛は1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) および protease inhibitor cocktail (Roche) を含む、もしくは含まない冷えたPBS内で目開き300 μ mのナイロンメッシュにこすりつけることで筋層から分離された (図iii)。この絨毛はチューブ内へ回収し、3,000 rpm、4°Cで1分間遠心分離することでペレット状にした。それから余分なPBSを除去し、ペレット状の絨毛に50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、5 mM MgCl₂、1 mM ethylenediaminetetraacetic acid、1% sodium dodecyl sulfate (SDS)、1 mM dithiothreitol (DTT)、1 mM PMSF および protease inhibitor cocktail を含む lysis 緩衝液を加えた。その後、氷中で Probe-type Sonicator である Misonix MICROSON Ultrasonic Cell Disruptor XL2000 を用いて10秒間 x 2回、超音波破碎を行うことでペレット状の絨毛を溶解した。最後に5分間、95°Cの加熱処理を行い、未破壊の細胞や核を取り除くために4°C、10,000 rpmになるまで遠

心したものを、小腸ライゼートとして用いた。ライゼートのタンパク質濃度の定量は bicinchoninic acid (BCA) 法により測定した (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific)。

7. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 法及びウエスタンブロッティング

BCA 法の結果からライゼートを P2 では 1lane あたり 15 μ g もしくは 1 μ g、E18.5 では 1lane あたり 5.5 μ g もしくは 1 μ g になるように、0.06% bromophenol blue、50 mM Tris-HCl (pH 6.8)、60% (w/v) glycerol、12% SDS および 10 mM DTT を含む 6x サンプルバッファーを 3 μ L 加え、MilliQ で全量を 18 μ L になるようにサンプル溶液を調製した。サンプル溶液は 55 °C で 5 分間の加熱、還元処理を行った。この試料溶液は e・パジエル 5-20% (アトー株式会社, E-T520L) を用いて 25mM Tris、192mM Glycine および 0.1% SDS を含む泳動用緩衝液内で、定電流モード 0.04 A で 80 分間泳動し、タンパク質の分離を行った。分離したタンパク質はウェット法により、転写用緩衝液 (24mM Tris、193mM glycine、20% methanol) 内で定電流モード 0.2 A、120 分間、PVDF 膜 (Immobilon™ Transfer Membranes (Millipore)) に転写した。転写膜は 5% もしくは 10% スキムミルク (明治ステップ (Meiji)) /T-BST (25mM Tris、137mM NaCl、2.7mM KCl、0.05% (v/v) Tween20) 内で 1 時間、室温で振盪させながらブロッキングした。その後、T-BST で洗浄し、5% もしくは 10% スキムミルク/T-BST 内で 1,000 倍希釈した抗 Rab7 抗体、5% スキムミルク/T-BST 内で 5,000 倍希釈した SNX1 抗体、5% スキムミルク/T-BST 内で 1,000 倍希釈した抗 Stx7 抗体および抗 Lamp2 抗体、5% もしくは 10% スキムミルク/T-BST 内で 1,000 倍希釈した抗 β -actin 抗体を 4 °C で一晩、振盪させながら一次抗体反応を行った。一次抗体を反応させた後、余分な抗体を T-BST で洗浄し、5% スキムミルク/T-BST 内で 5,000 倍希釈したペルオキシターゼ標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体もしくは抗ラット IgG 抗体 (Jackson Immuno Research)、5% もしくは 10% スキムミルク/T-BST 内で 2,000 倍希釈したペルオキシターゼ標識ロバ抗チキン IgY 抗体 (Jackson Immuno Research) 10% スキムミルク/T-BST 内で 5,000 倍希釈したペルオキシターゼ標識ロバ抗マウス IgG 抗体 (Jackson Immuno Research) を室温で 1 時間、振盪させながら二次抗体反応を行った。反応後、再び T-BST で 5 分間振盪する操作を 4 回繰り返して洗浄し

た。最後に Pierce Western Blotting Substrate Plus (Thermo Fisher SCIENTIFIC) を用いた化学発光法により CCD カメラ (ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare Life Sciences)) で検出した。バンドの強度は ImageQuant™ TL ソフトウェア (GE Healthcare Life Sciences) の Analysis Toolbox を用いて測定した。

8. 体重測定

雄または雌マウスの体重は出生直前および出生直後から離乳までグラフに示した週齢 (E18.5, P1, P8, P14, P21) で測定した。妊娠日齢は雄と雌マウスを交配させ、雌マウスのプラグ確認日を妊娠 0 日として計算した。出生日 (P0) は出生日前日 (E18.5) の 14 時以降の時点で未出産であることを確認し翌日、産仔したことを確認したうえで特定した。E18.5 マウスは母親マウスを午後 1 時以降に頸椎脱臼し開腹後、摘出した。その後電子天秤を用いて体重を測定した。出生後のマウスは午前 9-12 時に天秤を用いて体重を測定した。体重測定にはリッター数が 4 匹以上かつ 10 匹以下のマウスを用いた。すべてのマウスの DNA は尾より抽出し、性別は表 1 および 2 で示した Zfy-Fw2 と Zfy-Rv2 のプライマーセットを用いた PCR により確認した。

9. 統計的解析

2 グループ間の差を解析するために Student's unpaired t-test を行い、 $P < 0.05$ で有意な差があると判断した。データは平均値±標準誤差で示した。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、何よりもこの研究に携わる機会と環境をお与え頂き、さらに直接の御指導および激励のお言葉を賜りました同志社女子大学大学院生化学研究室 和田戈虹教授に深甚なる感謝の意を表します。

本論文作成において、御助言ならびに御校閲を賜りました同志社女子大学大学院薬物治療学研究室 高橋玲教授、生命物理化学研究室 桑原淳教授に深く感謝致します。また、本研究にあたり、さまざまな面でご支援くださいました大阪大学産業科学研究所 和田洋准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究に関する実験においては、貴重な時間を惜しみなく割いてくださり、数々の有益なる御助言を賜りました同志社女子大学大学院生化学研究室 川村暢幸助教、安川淳一朗助教、野田佳苗助教に深く感謝致します。さらに、研究生生活において励まし、支えてくださいました同志社女子大学生化学研究室の皆様を重ねて感謝申し上げます。

最後に、常に温かく見守り励まし続けてくれた家族に心から感謝致します。

参考文献

- Aoyama, M., G.H. Sun-Wada, A. Yamamoto, M. Yamamoto, H. Hamada, and Y. Wada. 2012. Spatial restriction of bone morphogenetic protein signaling in mouse gastrula through the mVam2-dependent endocytic pathway. *Dev Cell*. 22:1163-1175.
- Arrazola Sastre, A., M. Luque Montoro, H.M. Lacerda, F. Llaveró, and J.L. Zugaza. 2021. Small GTPases of the Rab and Arf Families: Key Regulators of Intracellular Trafficking in Neurodegeneration. *Int J Mol Sci*. 22.
- Baba, R., M. Fujita, C.E. Tein, and M. Miyoshi. 2002. Endocytosis by absorptive cells in the middle segment of the suckling rat small intestine. *Anat Sci Int*. 77:117-123.
- Baintner, K. 1994. Demonstration of acidity in intestinal vacuoles of the suckling rat and pig. *J Histochem Cytochem*. 42:231-238.
- Baintner, K. 2007. Transmission of antibodies from mother to young: Evolutionary strategies in a proteolytic environment. *Vet Immunol Immunopathol*. 117:153-161.
- Balderhaar, H.J., and C. Ungermann. 2013. CORVET and HOPS tethering complexes - coordinators of endosome and lysosome fusion. *J Cell Sci*. 126:1307-1316.
- Bielinska, M., N. Narita, and D.B. Wilson. 1999. Distinct roles for visceral endoderm during embryonic mouse development. *Int J Dev Biol*. 43:183-205.
- Bonifacino, J.S. 2014. Vesicular transport earns a Nobel. *Trends Cell Biol*. 24:3-5.
- Bonifacino, J.S., and B.S. Glick. 2004. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*. 116:153-166.
- Botelho, R.J., J.A. Efe, D. Teis, and S.D. Emr. 2008. Assembly of a Fab1 phosphoinositide kinase signaling complex requires the Fig4 phosphoinositide phosphatase. *Mol Biol Cell*. 19:4273-4286.
- Brocker, C., A. Kuhlee, C. Gatsogiannis, H.J. Balderhaar, C. Honscher, S. Engelbrecht-Vandre, C. Ungermann, and S. Raunser. 2012. Molecular architecture of the multisubunit homotypic fusion

- and vacuole protein sorting (HOPS) tethering complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:1991-1996.
- Casanova, J.E., and B. Winckler. 2017. A new Rab7 effector controls phosphoinositide conversion in endosome maturation. *J Cell Biol*. 216:2995-2997.
- Clark, S.L., Jr. 1959. The ingestion of proteins and colloidal materials by columnar absorptive cells of the small intestine in suckling rats and mice. *J Biophys Biochem Cytol*. 5:41-50.
- D'Costa, V.M., V. Braun, M. Landekic, R. Shi, A. Proteau, L. McDonald, M. Cygler, S. Grinstein, and J.H. Brumell. 2015. Salmonella Disrupts Host Endocytic Trafficking by SopD2-Mediated Inhibition of Rab7. *Cell Rep*. 12:1508-1518.
- Das, S., and D.G. Lambright. 2016. Membrane Trafficking: An Endosome Tether Meets a Rab and Collapses. *Curr Biol*. 26:R927-R929.
- Dong, X.P., D. Shen, X. Wang, T. Dawson, X. Li, Q. Zhang, X. Cheng, Y. Zhang, L.S. Weisman, M. Delling, and H. Xu. 2010. PI(3,5)P(2) controls membrane trafficking by direct activation of mucolipin Ca(2+) release channels in the endolysosome. *Nat Commun*. 1:38.
- Drozdowski, L.A., T. Clandinin, and A.B. Thomson. 2010. Ontogeny, growth and development of the small intestine: Understanding pediatric gastroenterology. *World J Gastroenterol*. 16:787-799.
- Dunst, S., T. Kazimiers, F. von Zadow, H. Jambor, A. Sagner, B. Brankatschk, A. Mahmoud, S. Spann, P. Tomancak, S. Eaton, and M. Brankatschk. 2015. Endogenously tagged rab proteins: a resource to study membrane trafficking in Drosophila. *Dev Cell*. 33:351-365.
- El Marjou, F., K.P. Janssen, B.H. Chang, M. Li, V. Hindie, L. Chan, D. Louvard, P. Chambon, D. Metzger, and S. Robine. 2004. Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis*. 39:186-193.
- Forbester, J.L., E.A. Lees, D. Goulding, S. Forrest, A. Yeung, A. Speak, S. Clare, E.L. Coomber, S.

- Mukhopadhyay, J. Kraiczy, F. Schreiber, T.D. Lawley, R.E.W. Hancock, H.H. Uhlig, M. Zilbauer, F. Powrie, and G. Dougan. 2018. Interleukin-22 promotes phagolysosomal fusion to induce protection against *Salmonella enterica* Typhimurium in human epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 115:10118-10123.
- Fujita, M., R. Baba, M. Shimamoto, Y. Sakuma, and S. Fujimoto. 2007. Molecular morphology of the digestive tract; macromolecules and food allergens are transferred intact across the intestinal absorptive cells during the neonatal-suckling period. *Med Mol Morphol*. 40:1-7.
- Fujita M, R.F., Neutra M. 1990. Convergence of apical and basolateral endocytic pathways at apical late endosomes in absorptive cells of suckling rat ileum in vivo. . *J Cell Sci*.
- Gan, J., G.M. Bornhorst, B.M. Henrick, and J.B. German. 2018. Protein Digestion of Baby Foods: Study Approaches and Implications for Infant Health. *Mol Nutr Food Res*. 62.
- Gonnella, P.A., and M.R. Neutra. 1984. Membrane-bound and fluid-phase macromolecules enter separate prelysosomal compartments in absorptive cells of suckling rat ileum. *J Cell Biol*. 99:909-917.
- Henning, S.J. 1985. Ontogeny of enzymes in the small intestine. *Annu Rev Physiol*. 47:231-245.
- Ho, C.Y., T.A. Alghamdi, and R.J. Botelho. 2012. Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate: no longer the poor PIP2. *Traffic*. 13:1-8.
- Huotari, J., and A. Helenius. 2011. Endosome maturation. *EMBO J*. 30:3481-3500.
- Hutagalung, A.H., and P.J. Novick. 2011. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev*. 91:119-149.
- Ichimura, T., T. Hatae, T. Sakurai, and T. Ishida. 1994. Three-dimensional architecture of the tubular endocytic apparatus and paramembranous networks of the endoplasmic reticulum in the rat visceral yolk-sac endoderm. *Cell Tissue Res*. 278:353-361.
- Kawamura, N., G.H. Sun-Wada, M. Aoyama, A. Harada, S. Takasuga, T. Sasaki, and Y. Wada.

2012. Delivery of endosomes to lysosomes via microautophagy in the visceral endoderm of mouse embryos. *Nat Commun.* 3:1071.
- Kawamura, N., K. Takaoka, H. Hamada, A.K. Hadjantonakis, G.H. Sun-Wada, and Y. Wada. 2020. Rab7-Mediated Endocytosis Establishes Patterning of Wnt Activity through Inactivation of Dkk Antagonism. *Cell Rep.* 31:107733.
- Knutton, S., A.R. Limbrick, and J.D. Robertson. 1974. Regular structures in membranes. I. Membranes in the endocytic complex of ileal epithelial cells. *J Cell Biol.* 62:679-694.
- Liu, K., R. Xing, Y. Jian, Z. Gao, X. Ma, X. Sun, Y. Li, M. Xu, X. Wang, Y. Jing, W. Guo, and C. Yang. 2017. WDR91 is a Rab7 effector required for neuronal development. *J Cell Biol.* 216:3307-3321.
- Louvard D, K.M., Hauri HP. 1992. The differentiating intestinal epithelial cell: establishment and maintenance of functions through interactions between cellular structures. . *Annu Rev Cell Biol.*
- Luzio, J.P., N.A. Bright, and P.R. Pryor. 2007a. The role of calcium and other ions in sorting and delivery in the late endocytic pathway. *Biochem Soc Trans.* 35:1088-1091.
- Luzio, J.P., P.R. Pryor, and N.A. Bright. 2007b. Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:622-632.
- Mao, X., Y. Fujiwara, and S.H. Orkin. 1999. Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase-mediated DNA excisions in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:5037-5042.
- Mima, J., C.M. Hickey, H. Xu, Y. Jun, and W. Wickner. 2008. Reconstituted membrane fusion requires regulatory lipids, SNAREs and synergistic SNARE chaperones. *EMBO J.* 27:2031-2042.
- Miner, G.E., K.D. Sullivan, A. Guo, B.C. Jones, L.R. Hurst, E.C. Ellis, M.L. Starr, and R.A. Fratti. 2019. Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate regulates the transition between trans-SNARE complex formation and vacuole membrane fusion. *Mol Biol Cell.* 30:201-208.
- Mohapatra, G., P. Gaur, P. Mujagond, M. Singh, S. Rana, S. Pratap, N. Kaur, S. Verma, V. Krishnan,

- N. Singh, and C.V. Srikanth. 2019. A SUMOylation-dependent switch of RAB7 governs intracellular life and pathogenesis of Salmonella Typhimurium. *J Cell Sci.* 132.
- Moore, S.A., P. Nighot, C. Reyes, M. Rawat, J. McKee, D. Lemon, J. Hanson, and T.Y. Ma. 2016. Intestinal barrier dysfunction in human necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg.* 51:1907-1913.
- Mu, Q., J. Kirby, C.M. Reilly, and X.M. Luo. 2017. Leaky Gut As a Danger Signal for Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 8:598.
- Muncan, V., J. Heijmans, S.D. Krasinski, N.V. Buller, M.E. Wildenberg, S. Meisner, M. Radonjic, K.A. Stapleton, W.H. Lamers, I. Biemond, M.A. van den Bergh Weerman, D. O'Carroll, J.C. Hardwick, D.W. Hommes, and G.R. van den Brink. 2011. Blimp1 regulates the transition of neonatal to adult intestinal epithelium. *Nat Commun.* 2:452.
- Nakamura, N., G.H. Sun-Wada, A. Yamamoto, Y. Wada, and M. Futai. 2001. Association of mouse sorting nexin 1 with early endosomes. *J Biochem.* 130:765-771.
- Nakamura, N., A. Yamamoto, Y. Wada, and M. Futai. 2000. Syntaxin 7 mediates endocytic trafficking to late endosomes. *J Biol Chem.* 275:6523-6529.
- Navis, M., T. Martins Garcia, I.B. Renes, J.L. Vermeulen, S. Meisner, M.E. Wildenberg, G.R. van den Brink, R.M. van Elburg, and V. Muncan. 2019. Mouse fetal intestinal organoids: new model to study epithelial maturation from suckling to weaning. *EMBO Rep.* 20.
- Pacha, J. 2000. Development of intestinal transport function in mammals. *Physiol Rev.* 80:1633-1667.
- Palm, W., and C.B. Thompson. 2017. Nutrient acquisition strategies of mammalian cells. *Nature.* 546:234-242.
- Pierzynowska, K., J. Wolinski, B. Westrom, and S.G. Pierzynowski. 2020. Maternal Immunoglobulins in Infants-Are They More Than Just a Form of Passive Immunity? *Front Immunol.* 11:855.

- Poquet, L., and T.J. Wooster. 2016. Infant digestion physiology and the relevance of in vitro biochemical models to test infant formula lipid digestion. *Mol Nutr Food Res.* 60:1876-1895.
- Randall, K.J., J. Turton, and J.R. Foster. 2011. Explant culture of gastrointestinal tissue: a review of methods and applications. *Cell Biol Toxicol.* 27:267-284.
- Remis, N.N., T. Wiwatpanit, A.J. Castiglioni, E.N. Flores, J.A. Cantu, and J. Garcia-Anoveros. 2014. Mucolipin co-deficiency causes accelerated endolysosomal vacuolation of enterocytes and failure-to-thrive from birth to weaning. *PLoS Genet.* 10:e1004833.
- Snoeck, V., B. Goddeeris, and E. Cox. 2005. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infect.* 7:997-1004.
- Takasuga, S., Y. Horie, J. Sasaki, G.H. Sun-Wada, N. Kawamura, R. Iizuka, K. Mizuno, S. Eguchi, S. Kofuji, H. Kimura, M. Yamazaki, C. Horie, E. Odanaga, Y. Sato, S. Chida, K. Kontani, A. Harada, T. Katada, A. Suzuki, Y. Wada, H. Ohnishi, and T. Sasaki. 2013. Critical roles of type III phosphatidylinositol phosphate kinase in murine embryonic visceral endoderm and adult intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:1726-1731.
- Tam, P.P., and R.R. Behringer. 1997. Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. *Mech Dev.* 68:3-25.
- Touchot, N., P. Chardin, and A. Tavitian. 1987. Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:8210-8214.
- Vancamelbeke, M., and S. Vermeire. 2017. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 11:821-834.
- Vazquez-Carretero, M.D., M. Palomo, P. Garcia-Miranda, I. Sanchez-Aguayo, M.J. Peral, M.L. Calonge, and A.A. Ilundain. 2014. Dab2, megalin, cubilin and amnionless receptor complex might mediate intestinal endocytosis in the suckling rat. *J Cell Biochem.* 115:510-522.

- Wada, Y., Y. Ohsumi, and Y. Anraku. 1992. Genes for directing vacuolar morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Isolation and characterization of two classes of vam mutants. *Journal of Biological Chemistry*. 267:18665-18670.
- Watts, C. 2012. The endosome-lysosome pathway and information generation in the immune system. *Biochim Biophys Acta*. 1824:14-21.
- Wilson JM, W.J., Neutra MR. 1991. Biogenesis of the apical endosome-lysosome complex during differentiation of absorptive epithelial cells in rat ileum. *J Cell Sci*.
- Wissig, S.L., and D.O. Graney. 1968. Membrane modifications in the apical endocytic complex of ileal epithelial cells. *J Cell Biol*. 39:564-579.
- Xie, Z., J. Long, J. Liu, Z. Chai, X. Kang, and C. Wang. 2017. Molecular Mechanisms for the Coupling of Endocytosis to Exocytosis in Neurons. *Front Mol Neurosci*. 10:47.
- Yamamoto, A., D.B. DeWald, I.V. Boronenkov, R.A. Anderson, S.D. Emr, and D. Koshland. 1995. Novel PI(4)P 5-kinase homologue, Fab1p, essential for normal vacuole function and morphology in yeast. *Mol Biol Cell*. 6:525-539.

図表

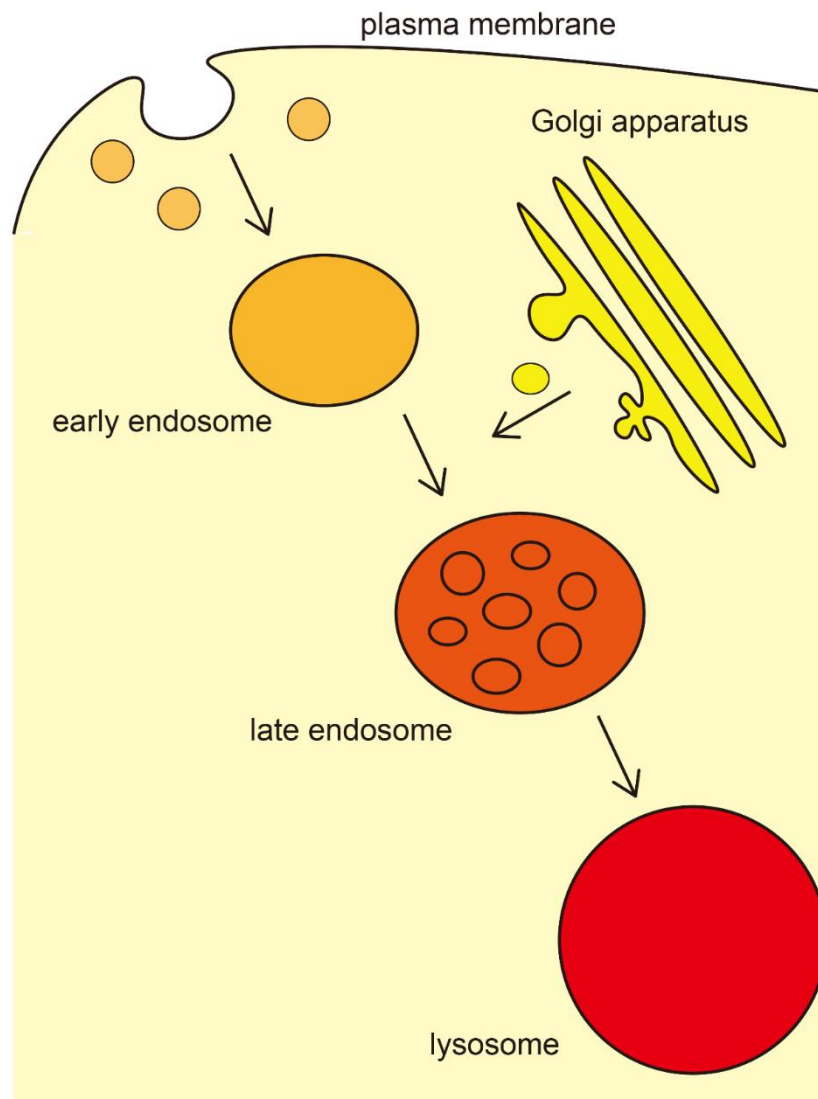


図1 エンドサイトーシス経路の模式図

細胞表面および細胞外の不要な高分子物質はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、初期エンドソーム、後期エンドソーム、リソソームへと運ばれる。その輸送過程は膜融合によって進行する。

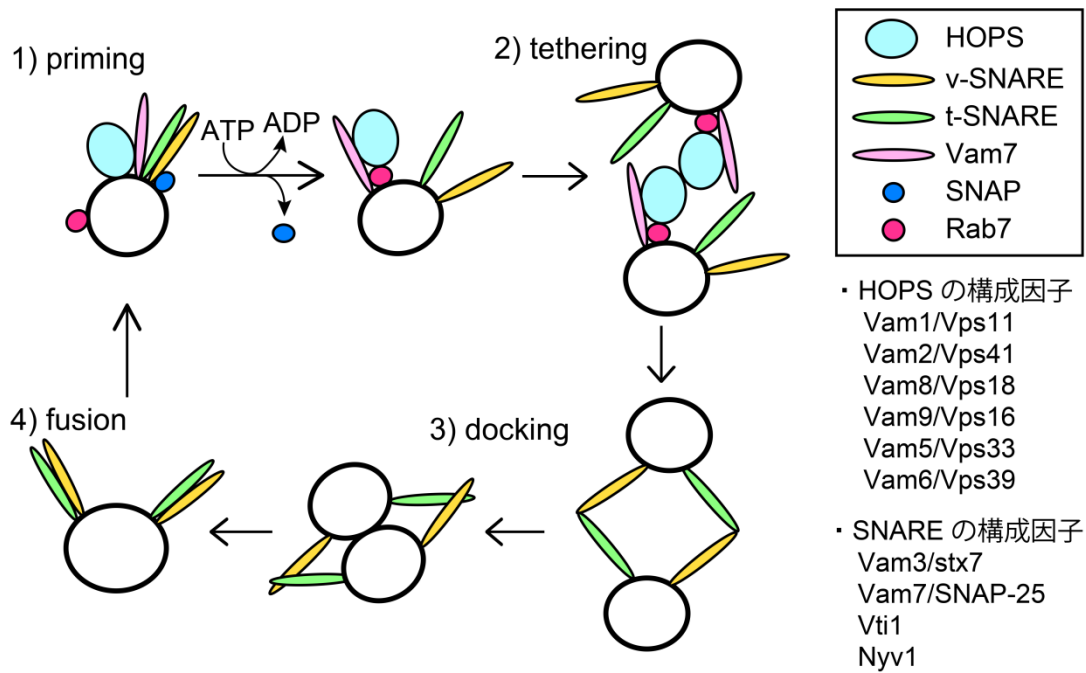


図2 液胞融合サイクルにおける HOPS と SNARE の相互作用モデル

HOPS 複合体は SNARE 複合体などさまざまな因子と相互作用しながら、液胞融合を制御している。

この反応は 4 段階の過程に分けられる。

1) プライミング (priming)

ATP 加水分解反応により、cis-SNARE 複合体が解離し、活性化される。またこの段階で、SNARE 複合体因子である Vam7 は SNARE から解離する。そして、HOPS、Rab7、Vam3 が複合体を形成する。

2) テザーリング (tethering)

小胞と目的の小胞が、HOPS、Rab7、Vam3 複合体によって繋がれる。

3) ドッキング (docking)

小胞と目的の小胞のそれぞれに存在する SNARE が結合し、trans-SNARE 複合体を形成することで小胞同士が結合する。

4) 融合 (fusion)

結合した小胞同士の膜が融合する。

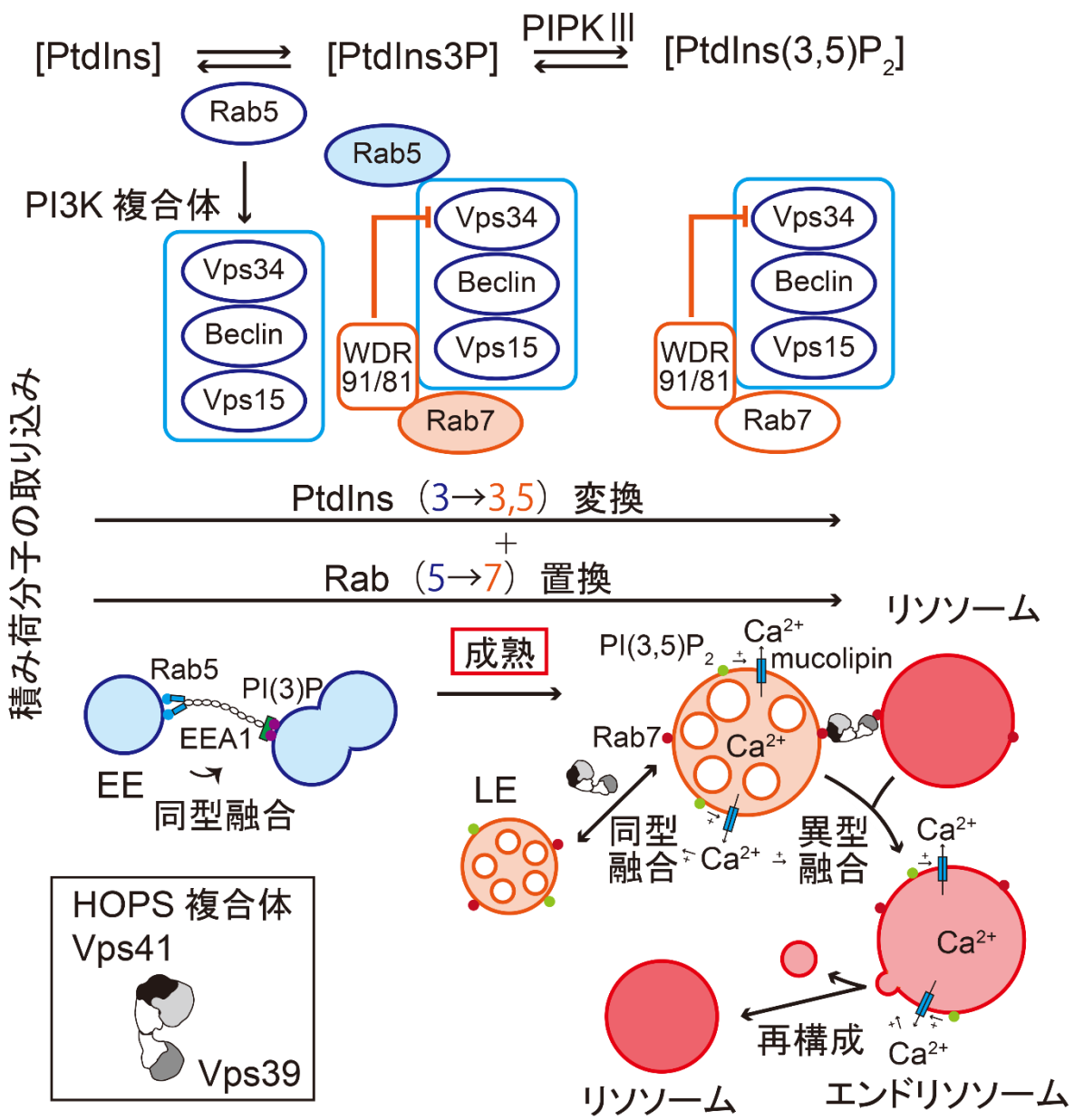


図3 Rab置換およびホスファチジルイノシトール (PtdIns) 変換を伴うエンドソームの成熟とエンドソームもしくはリソソームとの融合プロセス

エンドサイトーシスにより積み荷分子が細胞内へ取り込まれた後、形成されたエンドソームは成熟し、リソソームへ輸送される。成熟プロセスは Rab 置換と PtdIns 変換が同時に進行する。Rab 置換では、初期エンドソーム (EE) 膜に局在する Rab5 が Rab7 に変換され、Rab7 が局在する後期末期エンドソーム (LE) が形成される。PtdIns 変換では、EE 膜の PtdIns が主にホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) 複合体 (Vps34、Beclin、Vps15 を含む) の脂質キナーゼとして機能する Vps34 により PtdIns3-P へ変換された後、ホスファチジルイノシトール-3-リン酸 5-キナーゼ (PIP3K) によりさらにリン酸化され、PtdIns3, 5-P₂が豊富な LE が形成される。Vps34 は WDR91/81 (Rab7 のエフェクター) を介して負の制御を受ける。PtdIns3-P と Rab5 は EEA1 (Rab5 のエフェクター) との結合を介して EE 間の同型融合に関与する制御因子である。EEA1 はコイルドコイル構造を持ち、Fyve ドメイン (C 末端) は PtdIns3-P と、ジンクフィンガー (N 末端) は Rab5 と結合する。同型融合は LE 間においても行われ、Rab7 と HOPS 複合体との相互作用により行われる。この相互作用は LE とリソソームの融合 (異型融合) も制御する。LE にはカルシウム透過型カチオンチャネルの mucolipin が局在し、PtdIns3, 5-P₂により直接活性化されることで、LE やエンドリソソーム内のカルシウム (Ca²⁺) を細胞質へ放出する。放出された Ca²⁺は LE からリソソーム間の同型融合と異型融合、さらにはエンドリソソームからリソソームへの再構成に関与する膜動態を制御する。

図は(Casanova and Winckler, 2017)より引用し一部改変。

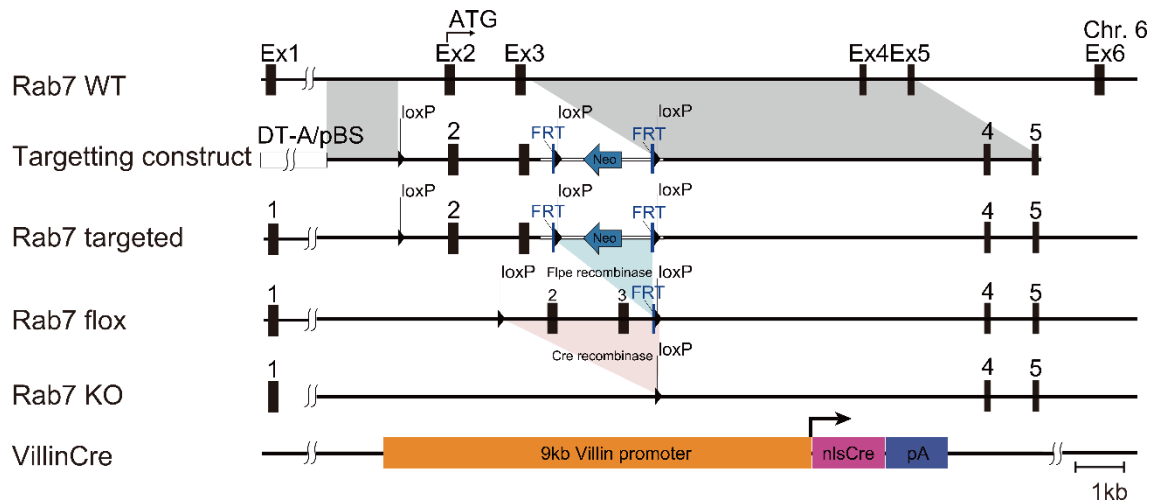
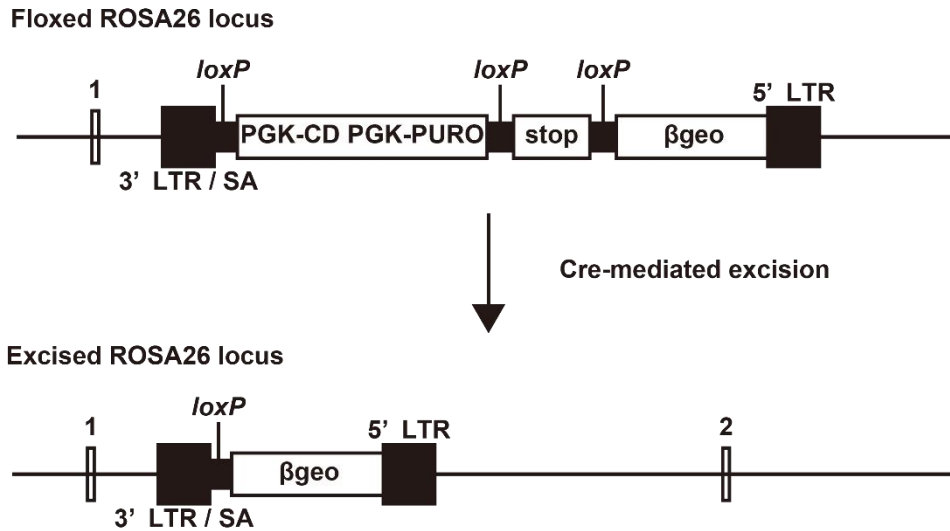


図 1-1 Cre 介在性 *Rab7* 遺伝子の欠損

野生型 *Rab7* 遺伝子座 (上)、ターゲティングコンストラクト (上から 2 番目)、標的遺伝子座 (上から 3 番目)、2 カ所の FRT 配列で挟んだネオマイシン (Neo) 耐性カセットのフリッパーゼ (flp) 介在性削除後の *Rab7* 遺伝子座のマップ (上から 4 番目)、*Villin-Cre* トランスジェニックマウスとの交配による 2 カ所の loxP 配列で挟んだエクソン 2 とエクソン 3 の Cre リコンビナーゼ介在性削除後の *Rab7* 遺伝子座 (上から 5 番目)、9 kb の *Villin* プロモーターに結合した Cre リコンビナーゼ遺伝子を含む遺伝子座のマップ (上から 6 番目)。上から 6 番目は(El Marjou et al., 2004)より引用し一部改変。

a



b

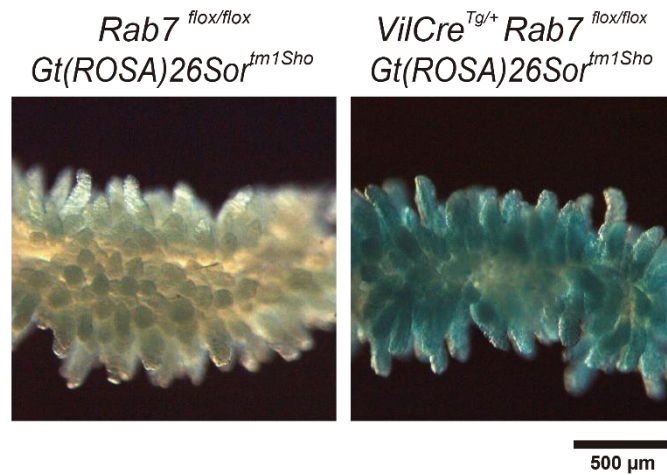


図 1-2 18.5 dpc 回腸 whole mount を用いた x-gal 染色アッセイ

a は β geo 遺伝子がトラップされた(プロウイルス)ROSA26 遺伝子座の改変を示す。LTR; long terminal repeat, SA ; スプライシングアクセプター, β geo ; β -gal-neomycin resistance fusion gene, CD ; cytosine deaminase, PURO ; puromycin。b は 18.5 dpc *Rab7^{flox/flox}* ; *Gt(ROSA)26Sor^{tm1Sho}* および *Rab7^{flox/flox}* ; *VilCre^{Tg/+}* ; *Gt(ROSA)26Sor^{tm1Sho}* マウスの回腸 whole mount を用いた LacZ 染色の結果を示す。a は(Mao et al., 1999)より引用し一部改変。

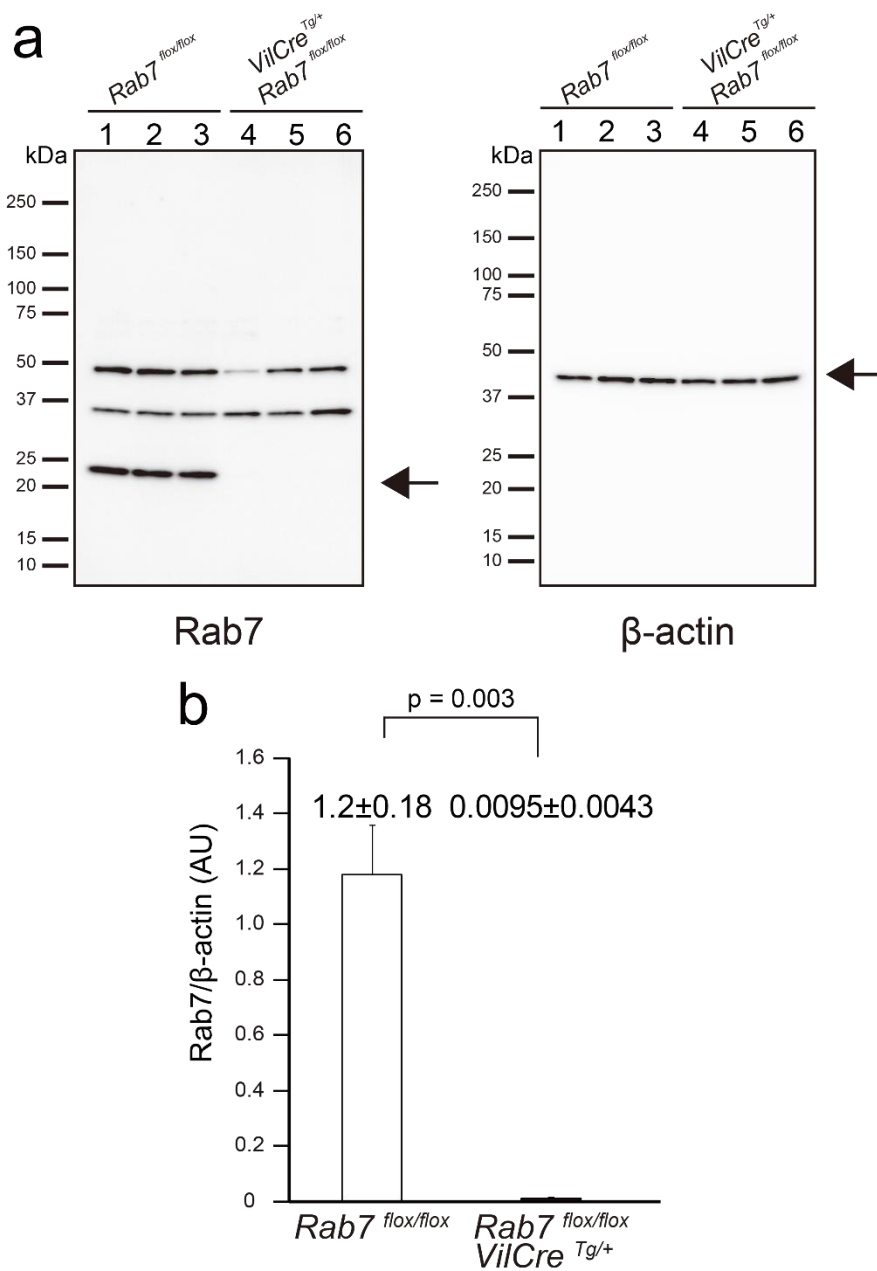


図 1-3 18.5 dpc 回腸粘膜ライゼートによる抗 Rab7 抗体および抗 β -actin 抗体のウェスタンブロッティング

抗 Rab7 抗体および抗 β -actin 抗体を用いて 18.5 dpc *Rab7^{flox/flox}* (n=3、レーン 1 から 3) および *Rab7^{flox/flox} ; VilCre^{Tg/+}* (n=3、レーン 4 から 6) の回腸粘膜溶解液によるウェスタンブロッティングを行った (a)。イミュノブロットより測定した Rab7 と β -actin の相対量を b に示す。水平バーは平均値 \pm SEM を表し、 p 値はグラフ中に示した。

Rab7/DNA

DIC/Rab7

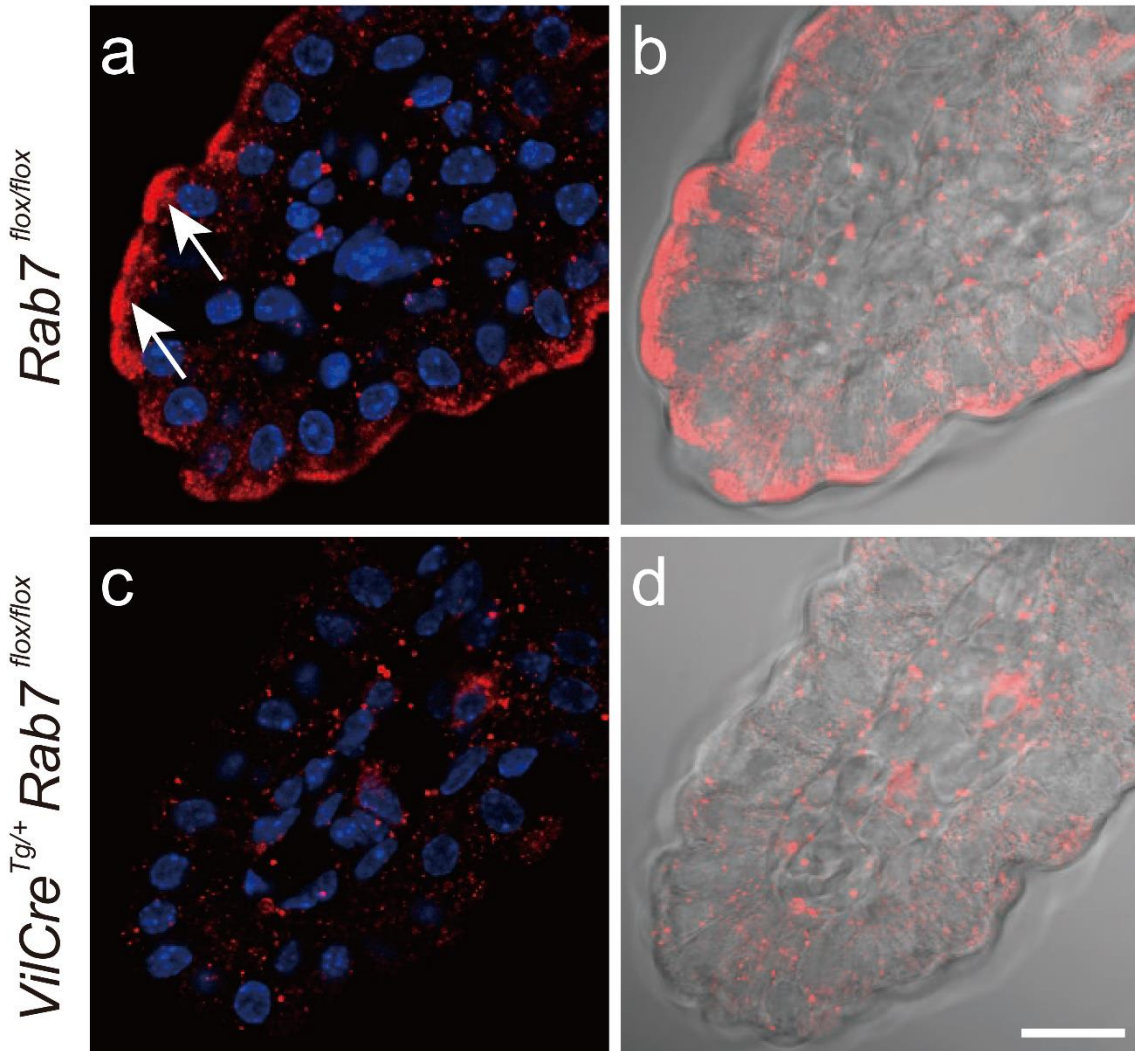


図 1-4 抗 Rab7 抗体を用いた 18.5 dpc 回腸の whole mount 蛍光免疫染色

抗 Rab7 抗体 (赤) を用いて 18.5 dpc *Rab7^{flox/flox}* および *Rab7^{flox/flox}, VilCre^{Tg/+}* マウスの回腸の whole mount 蛍光免疫染色を行った。対比染色には DAPI (青) を用いた。a および b は *Rab7^{flox/flox}*、c および d は *Rab7^{flox/flox}; VilCre^{Tg/+}* の回腸の絨毛を示す。矢印は回腸吸収上皮細胞の apical 側の Rab7 のシグナルを示す。バーは 20 μ m。

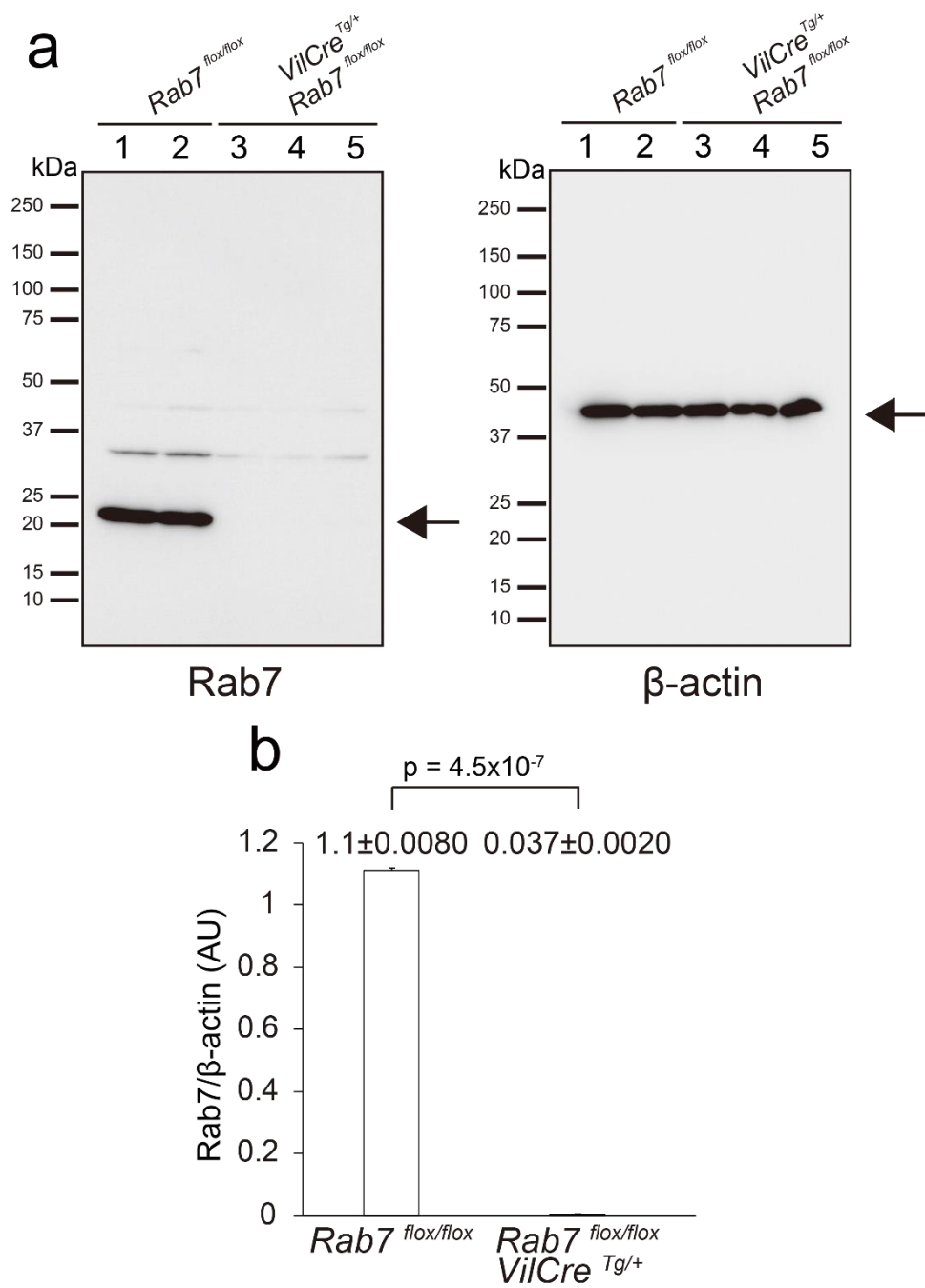


図 1-5 P2 回腸粘膜溶解液による抗 Rab7 抗体および抗 β -actin 抗体のウェスタンブロッティング

抗 Rab7 抗体および抗 β -actin 抗体を用いて P2 *Rab7^{flx/flx}* (n=2、レーン 1 から 2) および *Rab7^{flx/flx} ; VilCre^{Tg/+}* (n=3、レーン 3 から 5) の回腸粘膜溶解液によるウェスタンブロッティングを行った (a)。

イミュノブロットより測定した Rab7 と β -actin の相対量を b に示す。水平バーは平均値 \pm SEM を表し、*p* 値はグラフ中に示した。

Rab7/DNA

DIC/Rab7

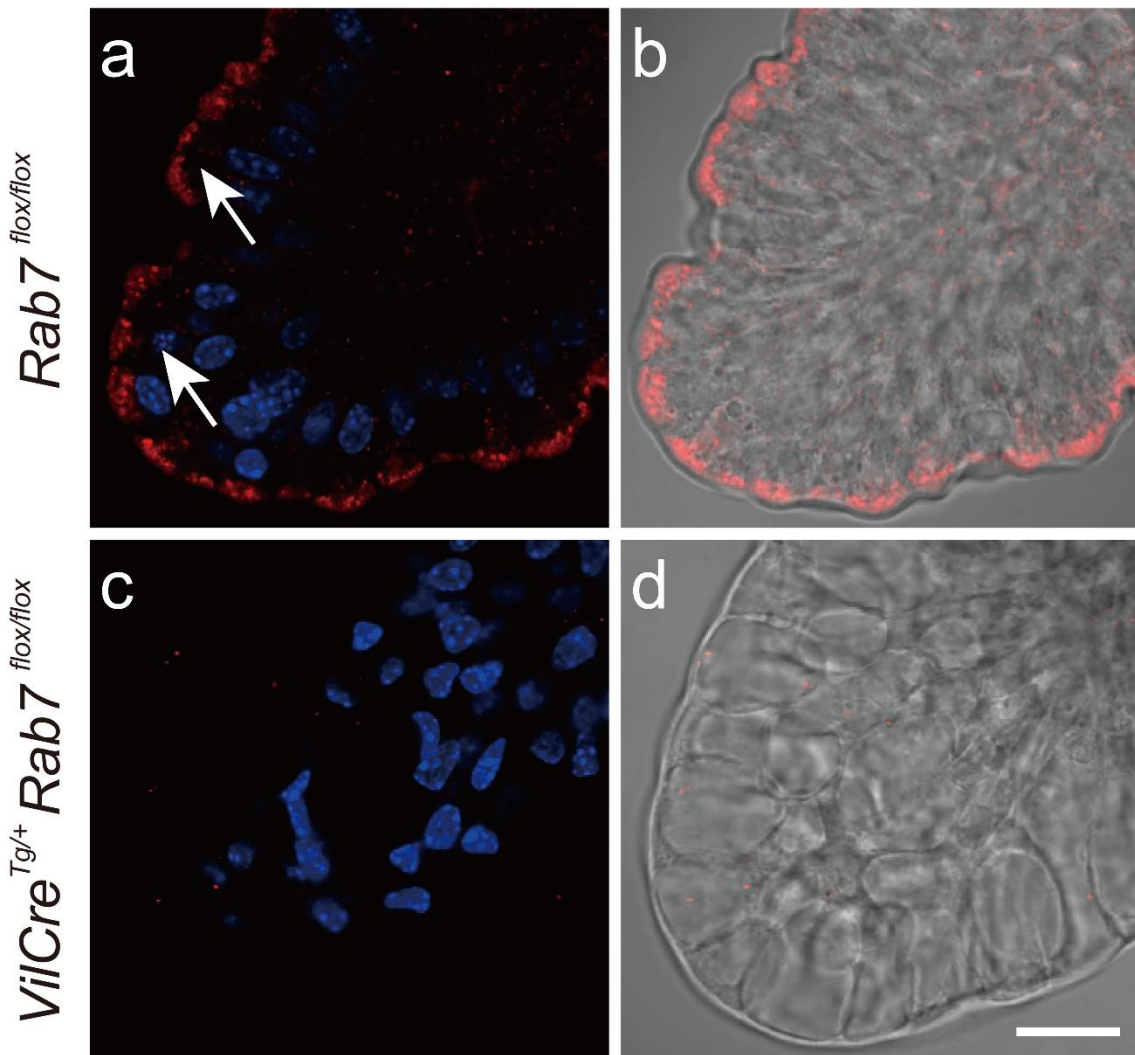


図 1-6 抗 Rab7 抗体を用いた P2 回腸の whole mount 蛍光免疫染色

抗 Rab7 抗体 (赤) を用いて P2 *Rab7^{flox/flox}* および *Rab7^{flox/flox} ; VilCre^{Tg/+}* マウスの回腸の whole mount 蛍光免疫染色を行った。対比染色には DAPI (青) を用いた。a および b は *Rab7^{flox/flox}*、c および d は *Rab7^{flox/flox} ; VilCre^{Tg/+}* の回腸の絨毛を示す。矢印は回腸吸収上皮細胞の apical 側の Rab7 のシグナルを示す。バーは 20 μ m。

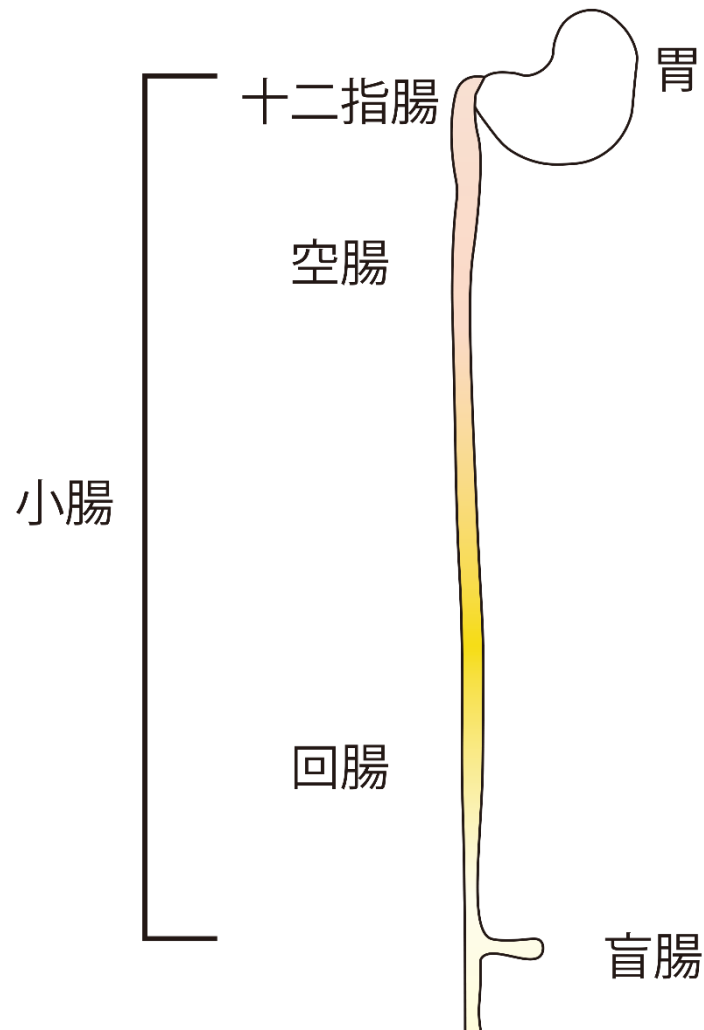


図 2-1 乳児期マウス小腸の模式図

成人期のヒトの小腸は、約 25cm の十二指腸、胃側（近位）から約 2/5 を占める空腸、盲腸側（遠位）から約 3/5 を占める回腸で構成されているが、各々の部位の明確な境界線は存在しない。乳児の小腸は小腸吸収上皮細胞のエンドサイトーシスに関連する膜系構造の違いによって、空腸型、中間部型、回腸型の 3 つの部位に分類されているが、これらの部位は近位から遠位にかけて小腸吸収上皮細胞の性質が徐々に変化することで構築されている(Baba et al., 2002)。さらに、小腸近位から遠位にかけて、小腸の色が薄い桃色から濃い黄色、そして淡黄色へと変化する。

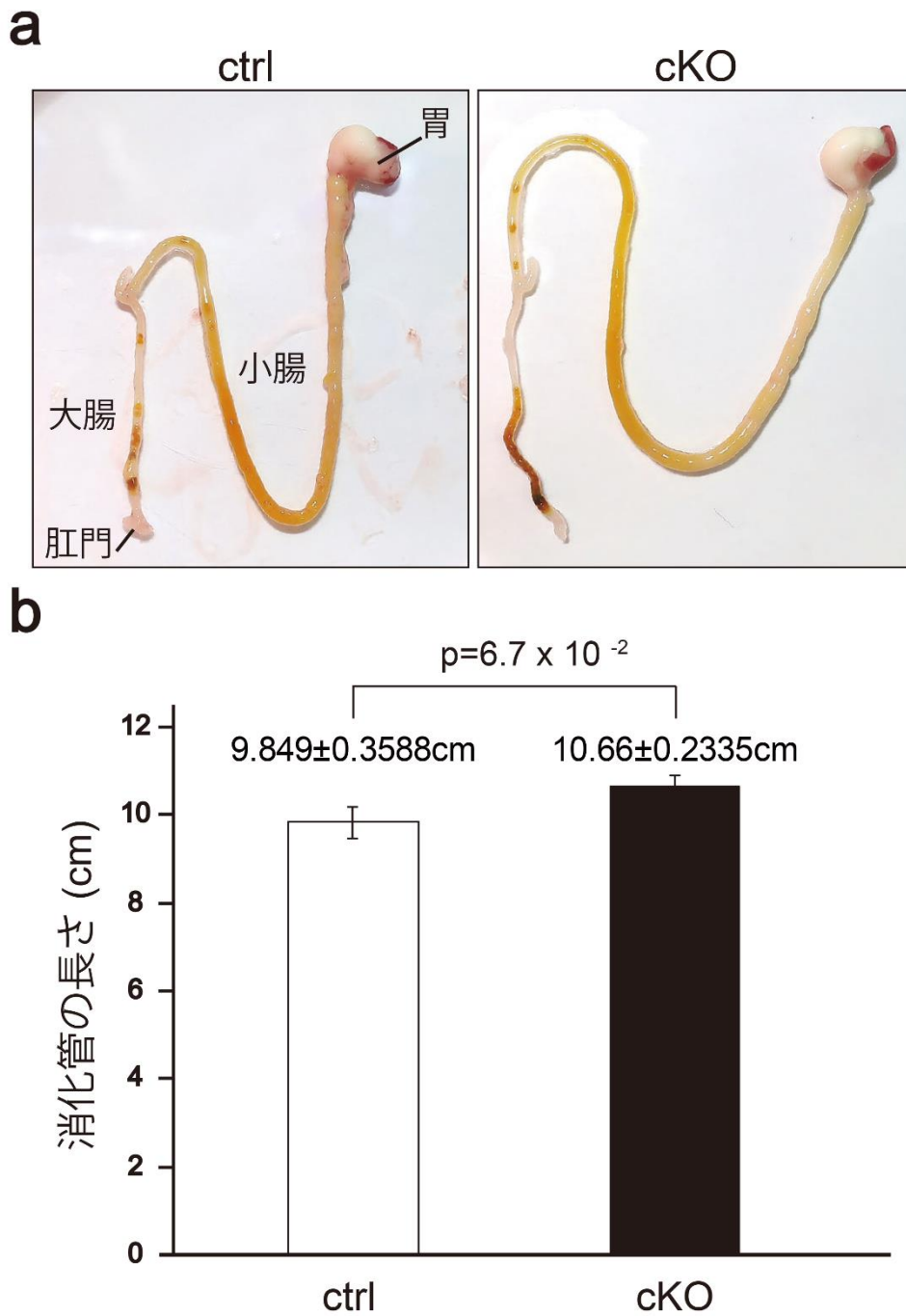


図 2-2 生後 2 日目 (P2) の ctrl および cKO マウスの消化管の全体像および長さの比較解析

P2 の ctrl および cKO マウス (ctrl ; n = 9, cKO ; n = 11) より消化管を摘出し、消化管 (幽門から肛門まで) の長さを測定した。a は ctrl および cKO における胃から肛門までの消化管の全体像をデジタルカメラで撮影した図を示す。b は ctrl および cKO における幽門から肛門までの小腸および大腸の長さの平均値 ± 標準誤差を示したグラフである。消化管における肉眼的な外観および長さに差はなかった ($p > 0.05$)。

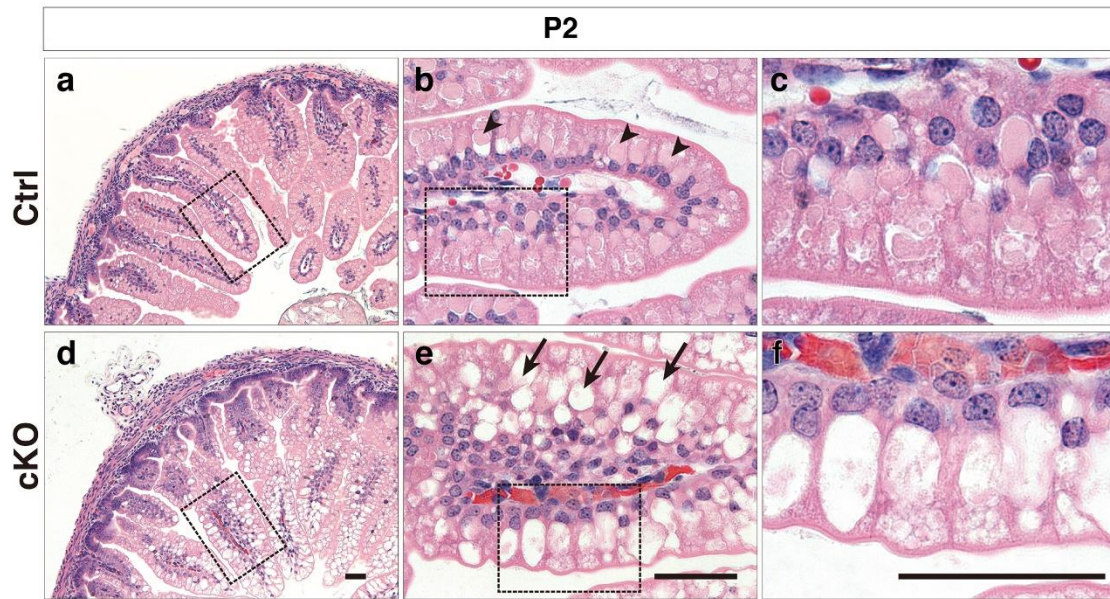


図 2-3 生後 2 日目 (P2) の ctrl および cKO マウスの小腸組織における H&E 染色

生後 2 日目のマウス小腸下部のテクノビットによる樹脂切片を作製し、H&E 染色を行った。a, d および b, e の囲った領域の高倍率画像をそれぞれ b, e および c, f で示す。P2 の ctrl マウス (a から c) と cKO マウス (d から f) の回腸吸収上皮細胞において、ctrl では eosin 陽性の大きな apical vacuole (AV) が観察されたが cKO では eosin 陰性の異常に大きな空胞が形成された。矢頭は ctrl 回腸吸収上皮における大きな AV を、矢印は cKO 欠損細胞で観察された異常な空胞化を示す。バーはそれぞれ 50 μ m を示す。

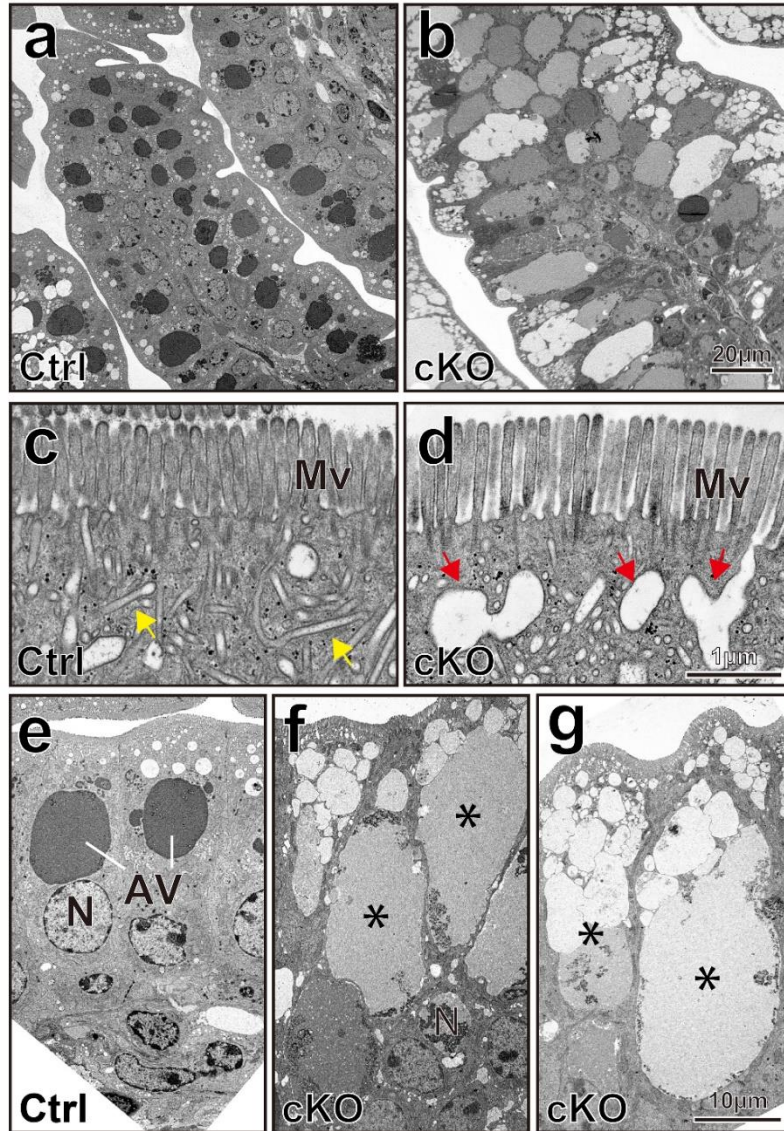


図 2-4 生後 2 日目 (P2) ctrl および cKO マウスの回腸吸収上皮細胞の透過型電子顕微鏡画像

P2 ctrl (a, c と e) と cKO (b, d, f と g) から摘出した回腸吸収上皮細胞の電子顕微鏡画像を示す。

ctrl 細胞では電子密度の高い大きな apical vacuole (AV) が存在する。アスタリスク (*) は cKO 細胞で観察された異常に大きな空胞を示す。ctrl 細胞における微絨毛下の管状小胞ネットワークは黄色矢印で示した (c)。cKO 細胞ではこの初期のエンドソームネットワークが膨らんでいた (d, 赤い矢印)。バーは a と b のパネルで 20 μ m、c と d で 1 μ m、e から g で 10 μ m を示す。AV ; large apical vacuoles, N ; nuclei of enterocytes, Mv ; microvilli。

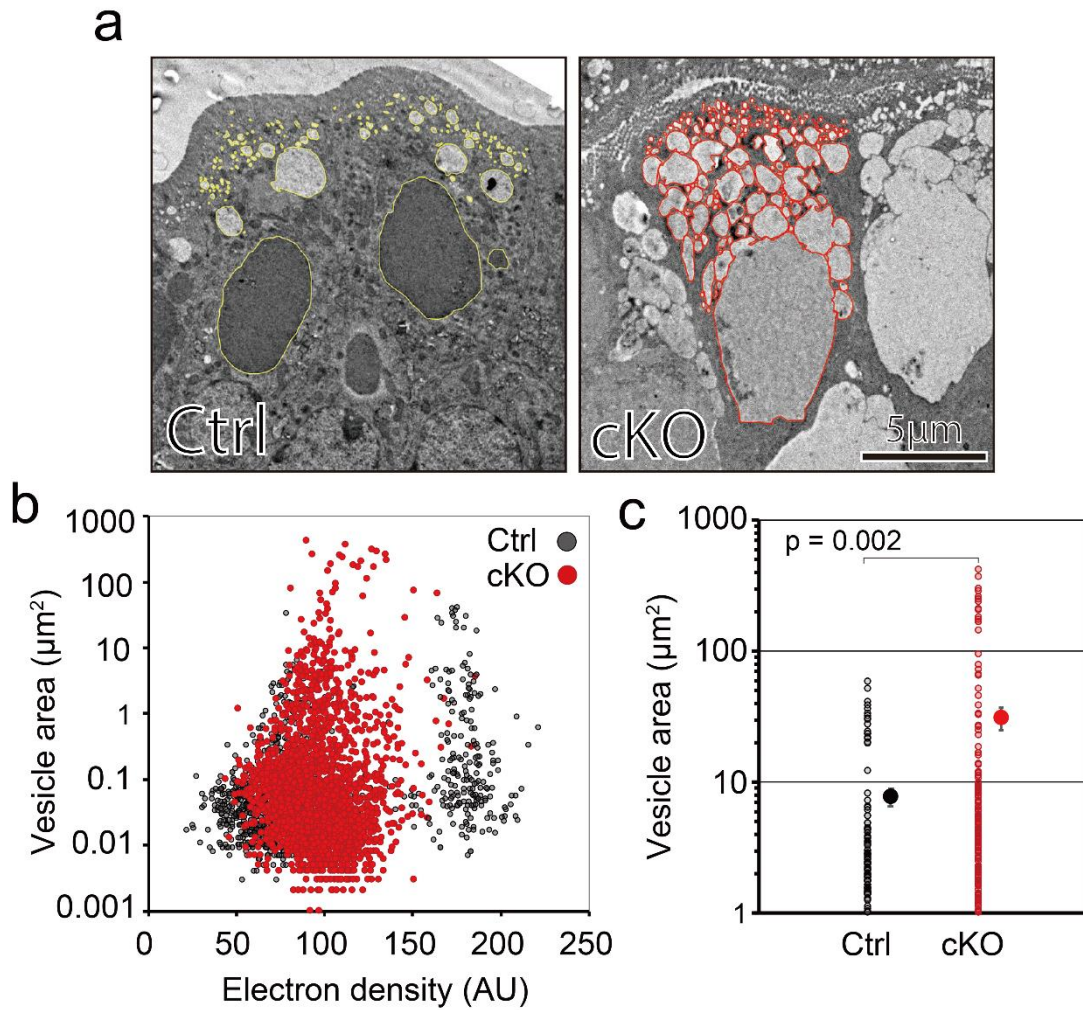


図 2-5 P2 ctrl および cKO 小腸吸収上皮細胞に存在する小胞または空胞の電子密度とサイズの比較
 P2 の ctrl 細胞における細胞内小胞の大きさ（細胞数 = 23, a の黄色線で示したように選択）および cKO 細胞内空胞の大きさ（細胞数 = 18, a の赤色線で示したように選択）の分布を電子顕微鏡画像上で測定し、Scatter plot で示した (b)。小胞や空胞サイズの分布 ($> 1 \mu\text{m}^2$) は c で示している（統計的な有意性は student's *t*-test の両側検定で評価した）。cKO 細胞には電子密度が低く、 $100 \mu\text{m}^2$ 以上のサイズを持つ大きく膨らんだ空胞構造が蓄積した (b, c)。バーは $5 \mu\text{m}$ を示す (a)。水平バーは平均値 \pm SEM を表し、*p* 値はグラフ中に示した。

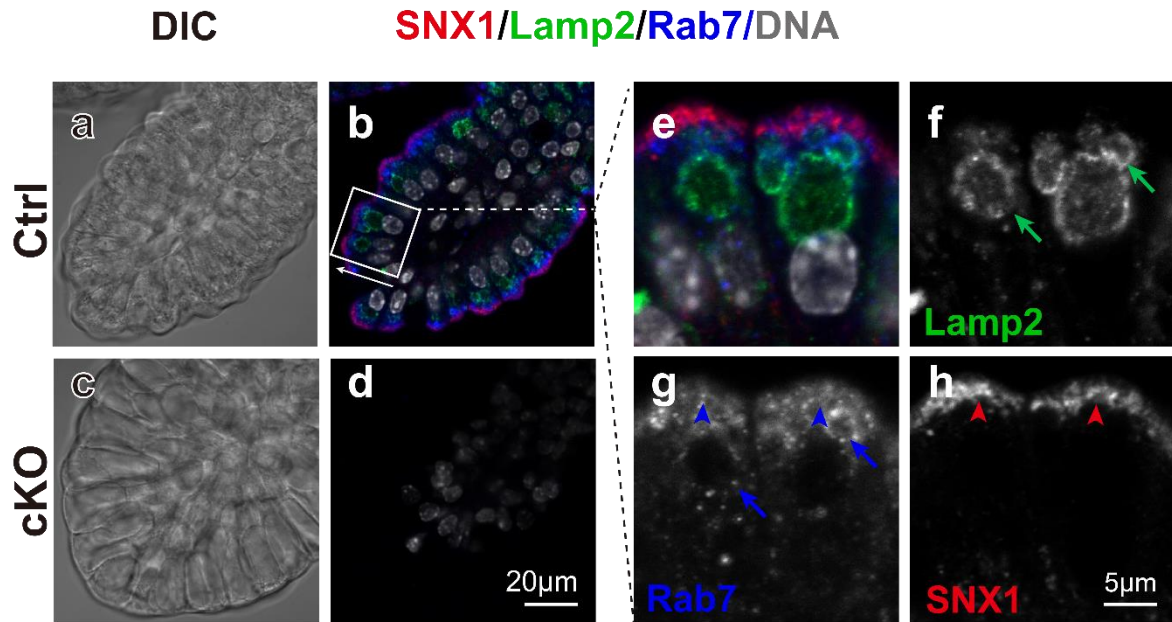


図 3-1 抗 Rab7 抗体、抗 Lamp2 抗体、抗 SNX1 抗体を用いた P2 回腸 whole mount 蛍光免疫染色
 ctrl (a と b) および cKO 細胞 (c と d) におけるエンドサイトーシスマーカーの SNX1 (赤)、Lamp2
 (緑) および Rab7 (青) の局在。b の ctrl 腸細胞における囲ったエリアの高倍率の画像は e から h
 で示されている。矢印と矢頭はオルガネラマーカーの重なりを示す。バーは a から d のパネルで
 20µm を、e から h のパネルで 5µm を示す。

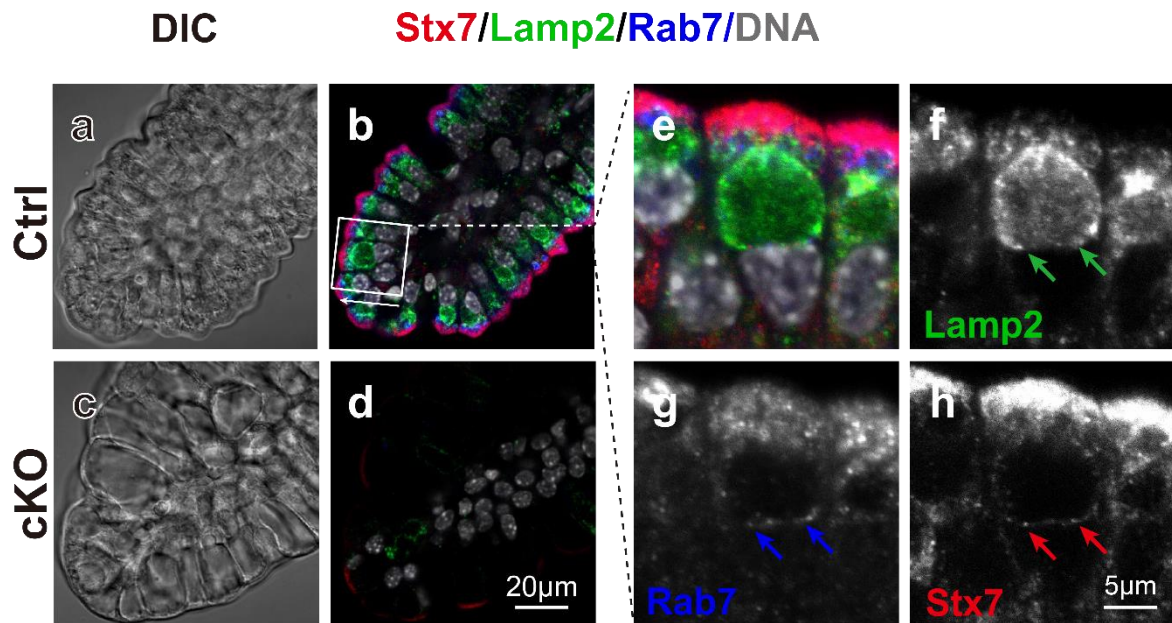


図 3-2 抗 Rab7 抗体、抗 Lamp2 抗体、抗 Stx7 抗体を用いた P2 回腸 whole mount 蛍光免疫染色
 ctrl (a と b) および cKO 腸細胞 (c と d) におけるエンドサイトーシスマーカーの Stx7 (赤)、Lamp2
 (緑) および Rab7 (青) の局在。b の ctrl 腸細胞における囲ったエリアの高倍率の画像は e から h
 で示されている。矢印と矢頭はオルガネラマーカーの重なりを示す。バーは a から d のパネルで
 20µm を、e から h のパネルで 5µm を示す。

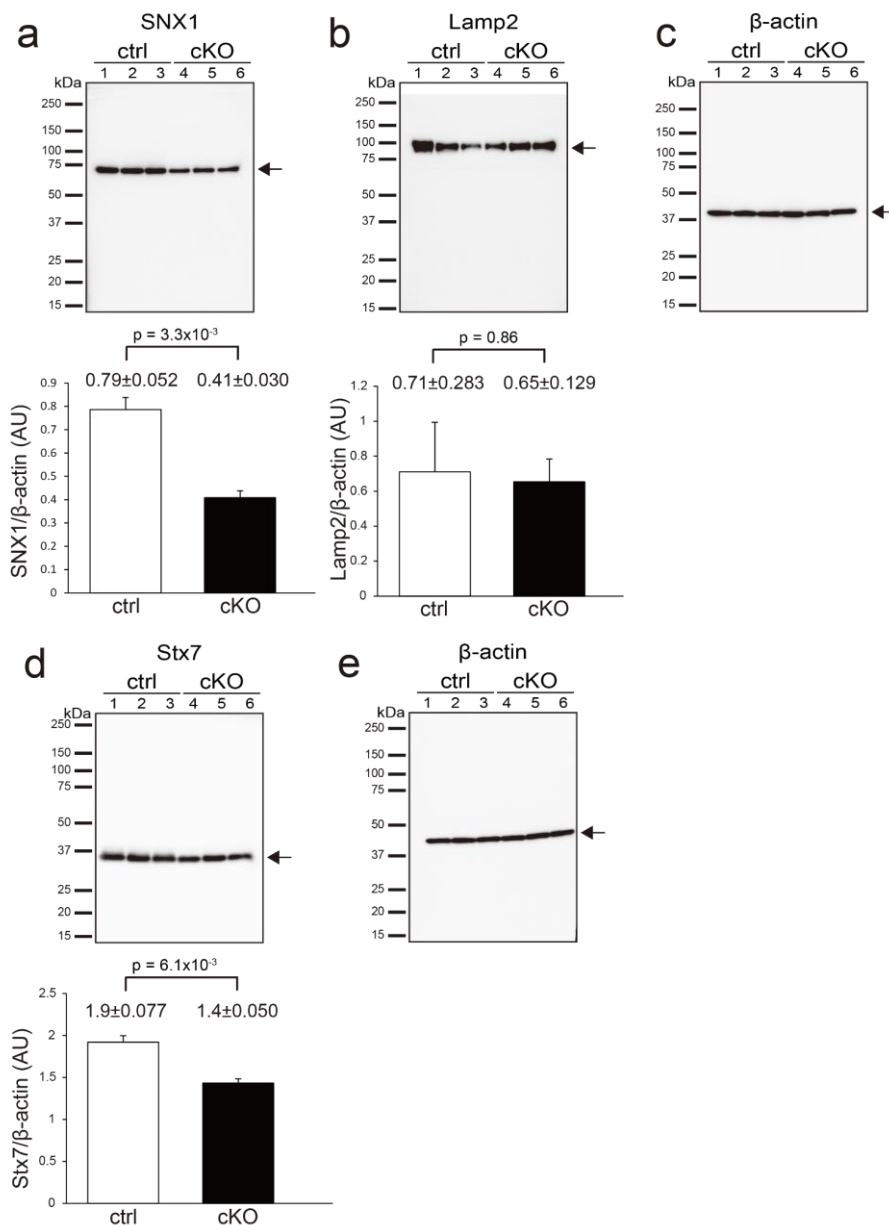


図 3-3 P2 回腸粘膜溶解液を用いた抗 SNX1 抗体、抗 Stx7 抗体、抗 Lamp2 抗体、抗 β -actin 抗体のウェスタンブロッティング

抗 SNX1 抗体 (a) および抗 Lamp2 抗体 (b)、抗 Stx7 抗体 (d)、抗 β -actin 抗体 (c または e) を用いて P2 ctrl (n=3、レーン 1 から 3) および cKO (n=3、レーン 4 から 6) の回腸粘膜溶解液を用いたウェスタンブロッティングを行った。イミュノブロットより測定した各々のタンパク質と β -actin の相対量 (a または b のメンブレン/c のメンブレン, d のメンブレン/e のメンブレン) をグラフに示す。水平バーは平均値 \pm SEM を表し、 p 値はグラフ中に示した。

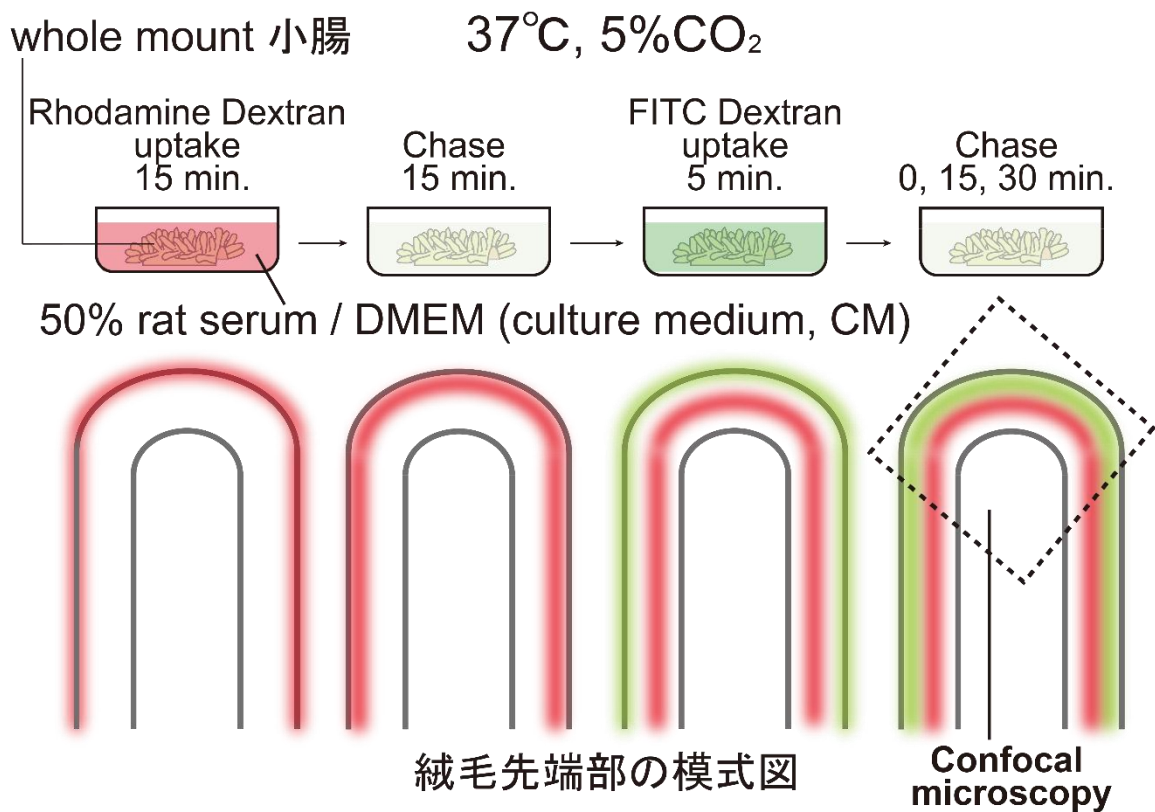


図 4-1 uptake 実験の模式図

50%ラット血清を含む DMEM (Culture Medium, CM) 内で 30 分間インキュベートした腸組織をまず、tetramethylrhodamine-dextran (RD) を含む CM 内へ移し、15 分間インキュベートした。その後、色素を含まない CM 内で 15 分間チェイスした。さら FITC-dextran (FD) を含む CM 内で 5 分間インキュベートし、最後に 0 分、15 分、30 分間、色素を含まない CM 内でチェイスした。すべての工は、5 % CO₂、37°C の条件下で行った。チェイス終了後は腸組織を 4 % PFA で一晩固定した。

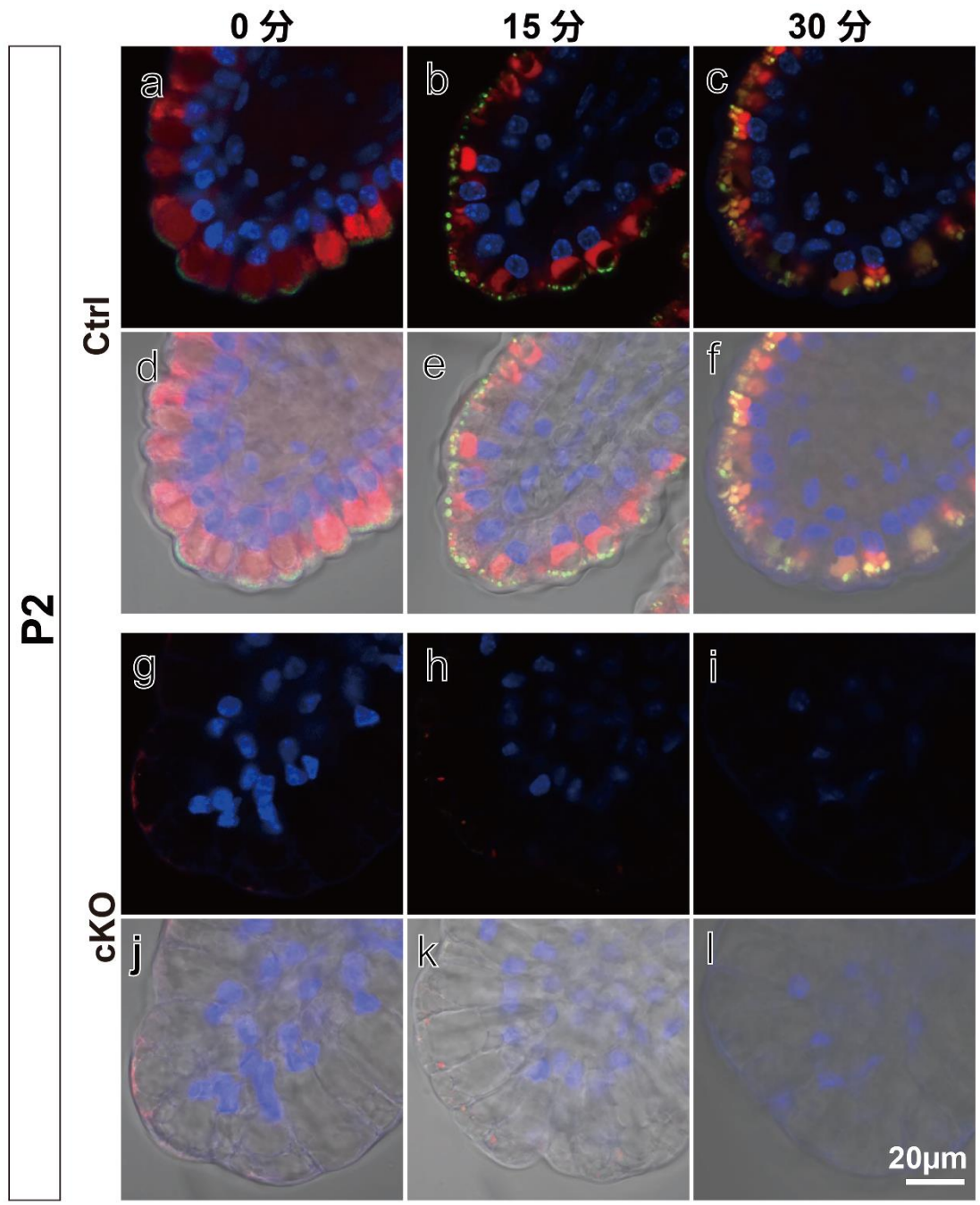


図 4-2 P2 マウス小腸吸収上皮細胞における uptake 実験および cKO との比較

小腸吸収上皮細胞における蛍光 dextran を用いたエンドサイトーシス。P2 腸を培養し rhodamine-dextran (RD, 赤) で 15 分間標識した後、15 分間チェイスした。さらに fluorescein-dextran (FD, 緑) で 5 分間パルス標識し、その後、図に示した時間通りにチェイスした。a-f は ctrl、g-l は cKO 細胞を示す。微分干渉観察 (Differential Interference Contrast; DIC) を重ね合わせた画像は d から f および j から l で示している。

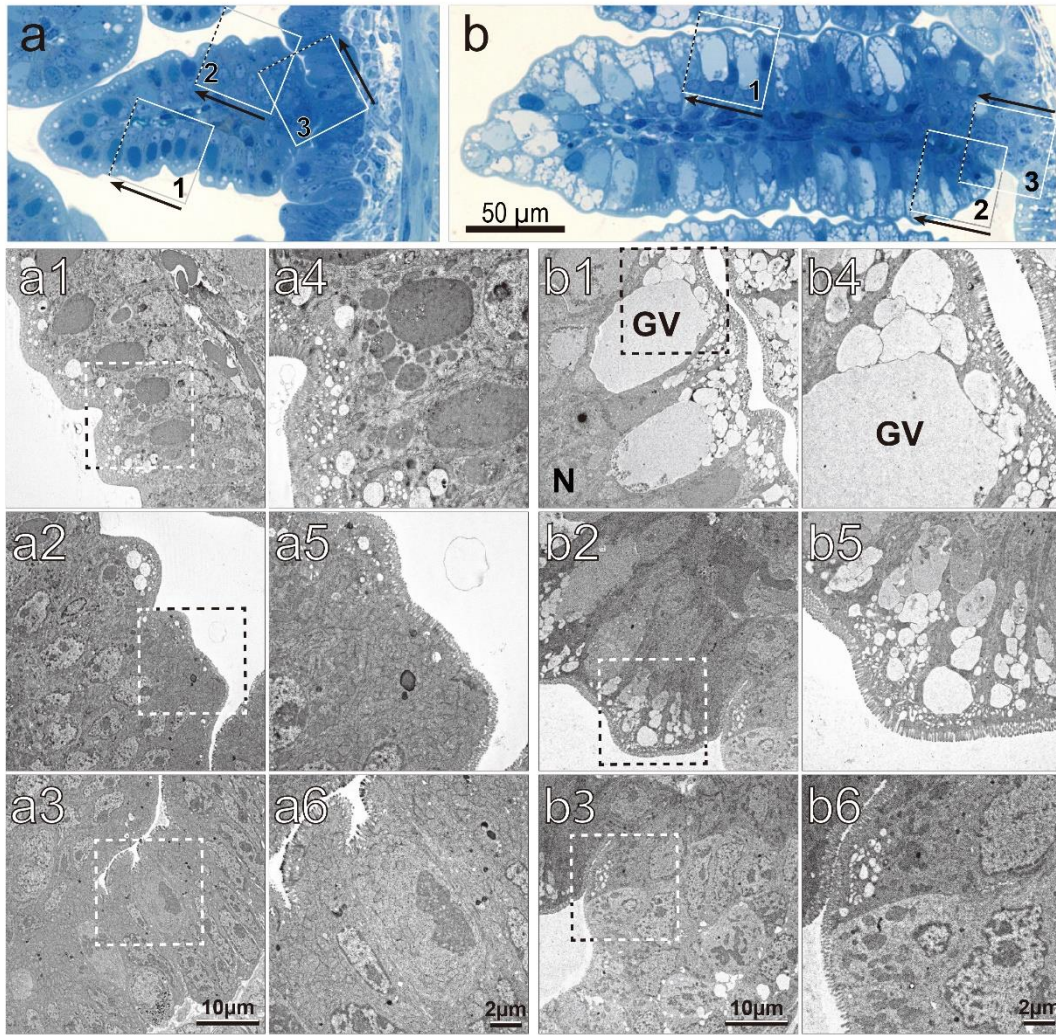


図 5-1 P2 Rab7 欠損マウスの小腸吸収上皮細胞における空胞化の発達

出生 2 日目 (P2) の control マウスおよび cKO マウスにおける小腸絨毛の Toluidine Blue 染色 (a は ctrl の小腸絨毛、b は cKO の小腸絨毛)。絨毛先端近くの小腸吸収上皮細胞における電子顕微鏡画像は a1 と b1 で、絨毛の基底付近の小腸吸収上皮細胞は a2 と b2、それから基底の小腸吸収上皮細胞は a3 と b3 で示した。a1-a3 および b1-b3 における囲まれた領域はそれぞれ a4-a6 および b4-b6 で示した。N, nucleus; GV, abnormal gigantic vacuole。バーは a と b で 50 μ m を、a1 から a3 と b1 から b3 のパネルで 10 μ m を、a4 から a6 と b4 から b6 のパネルで 2 μ m を示す。水平バーは平均値 \pm SEM を表し、*p* 値はグラフ中に示されている。

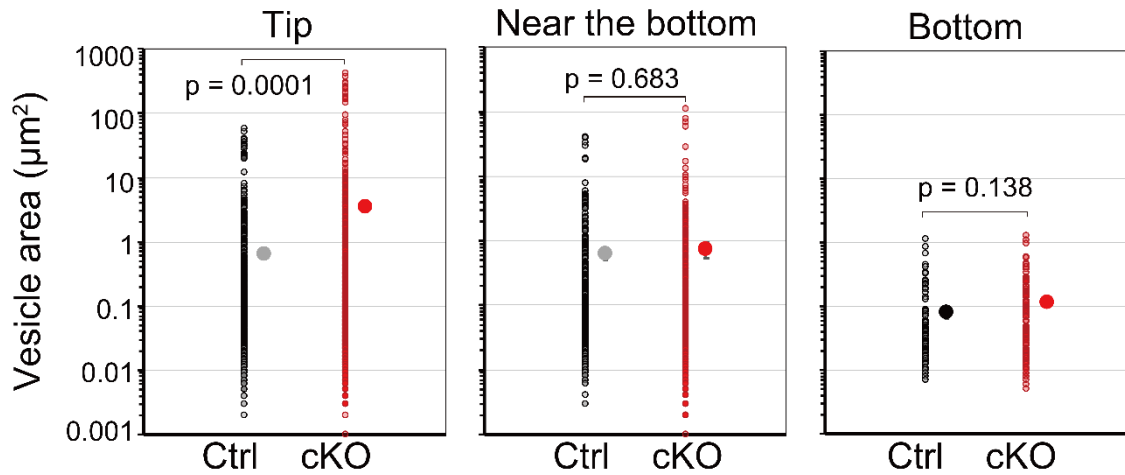


図 5-2 P2 cKO マウスの小腸絨毛基底 (bottom)、絨毛付近 (near the bottom)、および絨毛先端 (tip) の小腸吸収上皮細胞で発達した空胞のサイズの測定

小腸吸収上皮細胞の細胞内に存在する小胞の面積を測定し (ctrl; n=55, cKO: n=32)、その分布を c に示した (統計的な有意性は student's *t*-test の両側検定で評価した)。空胞化した小腸吸収上皮細胞は絨毛に沿って重症化する勾配を示し、この勾配は細胞の年齢に対応する。基底の若い小腸吸収上皮細胞については空胞のサイズに問題がないように見えるが、先端においては空胞化が最も顕著となる。

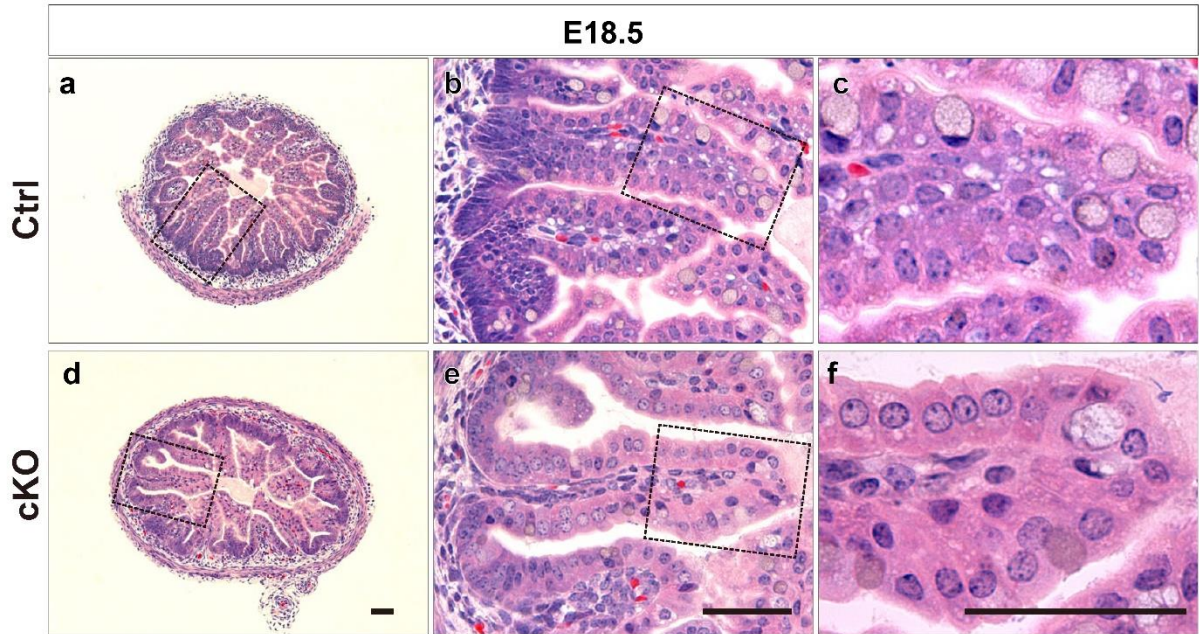


図 5-3 18.5dpc ctrl および cKO 小腸組織の HE 染色

Hematoxylin and eosin (HE) 染色を行った腸のテクノビット包埋切片で、囲った領域の高倍率画像が示されている。HE 染色を行った 18.5dpc (E18.5) における ctrl 胎児 (a から c) と cKO 胎児 (d から f) におけるの回腸では顕著な空胞形成は観察されなかった。バーは 50 μ m。

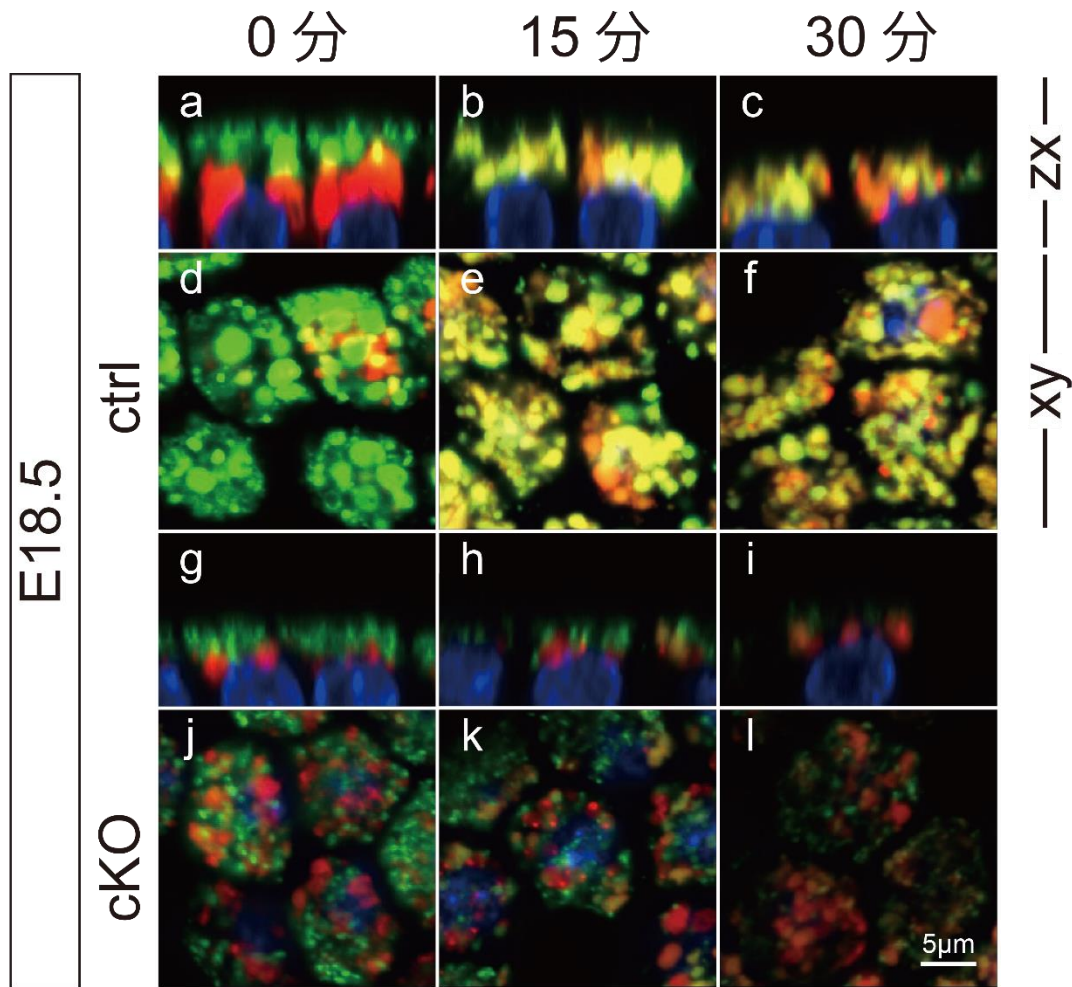


図 5-4 18.5dpc マウス小腸吸収上皮細胞における uptake 実験および cKO との比較

小腸吸収上皮細胞における蛍光 dextran を用いたエンドサイトーシス。まず 18.5dpc 腸を培養し rhodamine-dextran (RD, 赤) で 15 分間標識した後、15 分間チェイスした。さらに fluorescein-dextran (FD, 緑) で 5 分間パルス標識し、その後、図に示した時間通りにチェイスした。蛍光標識された小腸は連続切片像を取得できる z-stack 機能で 0.48µm の厚さで a-f は ctrl、g-l は cKO 細胞を示した。ctrl の小腸吸収上皮細胞では、最初に FD が apical vacuole の周辺で観察され (a と d)、その 15 分後には小胞が apical vacuole と融合しており (b と e)、最終的にほとんどの apical vacuole が黄色くなった (c と f)。18.5dpc cKO 小腸吸収上皮細胞は RD や FD が取り込まれたが (g と j)、オルガネラのサイズが小さく、RD と FD が混ざっていないオルガネラも観察された (h、k、i と l)。zx 画像は Zeiss (blue edition) software を用いて編集した。バーは 5µm。



図 6-1 P2 ctrl および cKO マウスの胃

P2 の同腹仔のペアの画像は cKO 仔の胃が正常な仔の胃と同様にミルクで満たされたということを示し (矢印)、飲乳および摂取が cKO で正常であった。

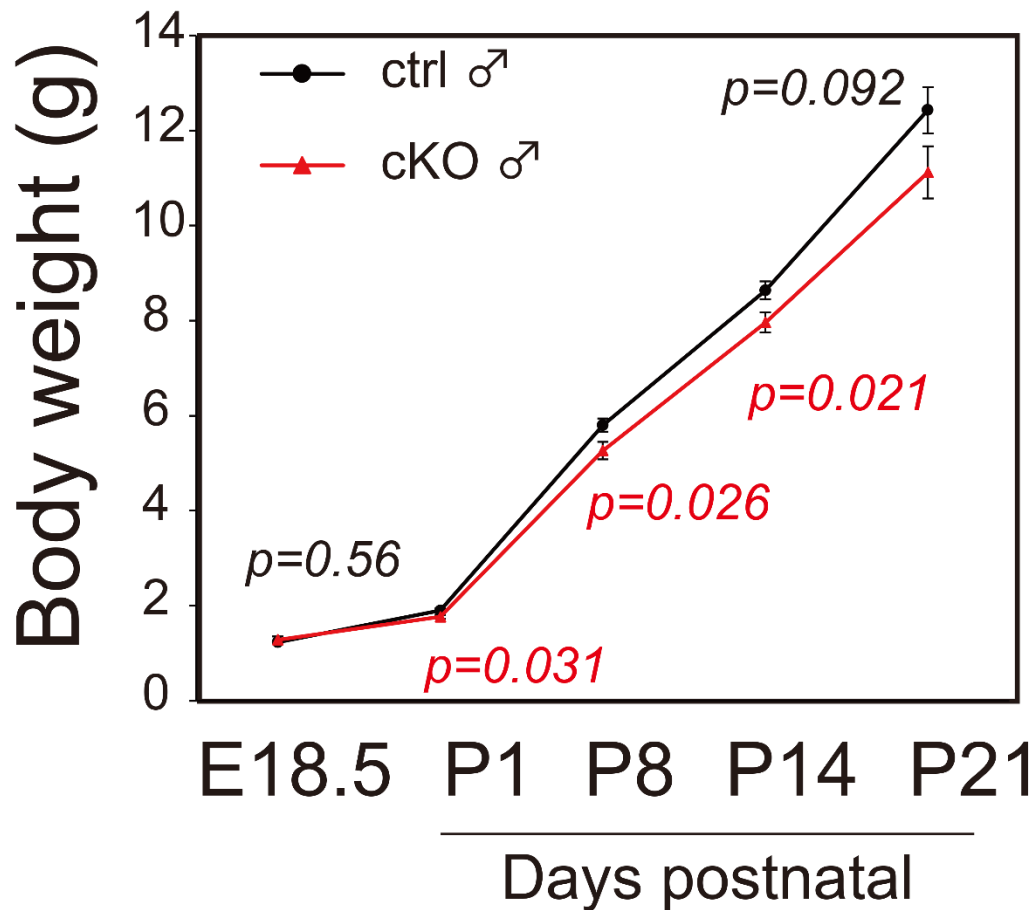


図 6-2 ctrl および cKO 雄マウスの出生直前から離乳までの体重測定グラフ

雄マウス (ctrl に対しては n=33 [day1]、n=17 [day8]、n=43 [day14]、n=17 [day21] ; cKO に対しては n=32 [day1]、n=11 [day8]、n=31 [day14]、n=11 [day21]) の体重は誕生から図に示したタイミングで観察した。18.5 dpc (E18.5) の仔は母マウスから取り除き、それらの雄の体重 (ctrl、n=12 ; cKO、n=15) を測定した。胎児および乳幼児の性別は Y 染色体の Zfy 遺伝子座の PCR 増幅により決定された。エラーバーは SEM を表し、p 値はグラフ中に示されている。

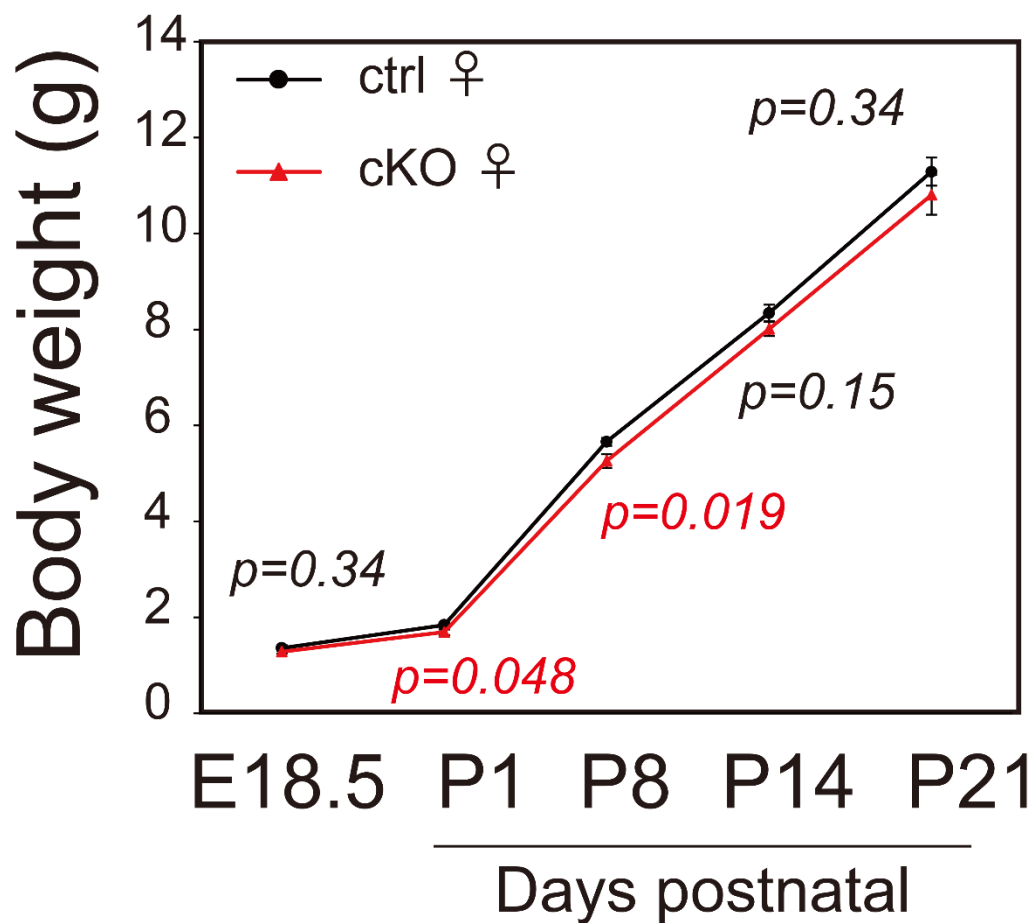
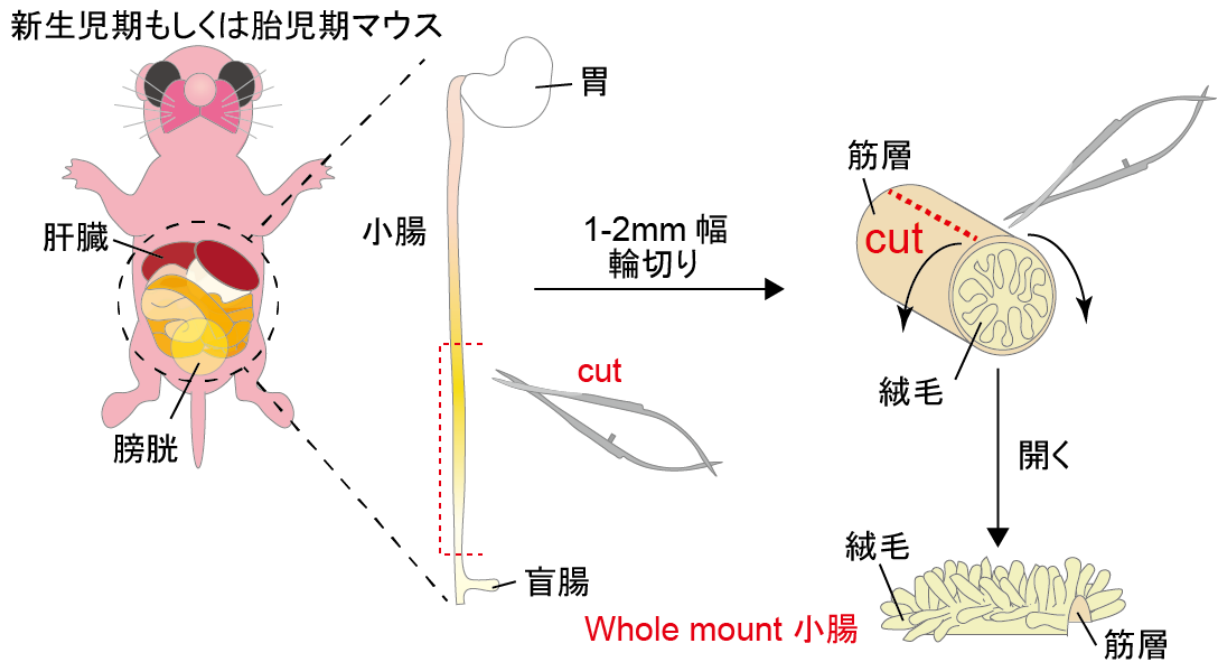


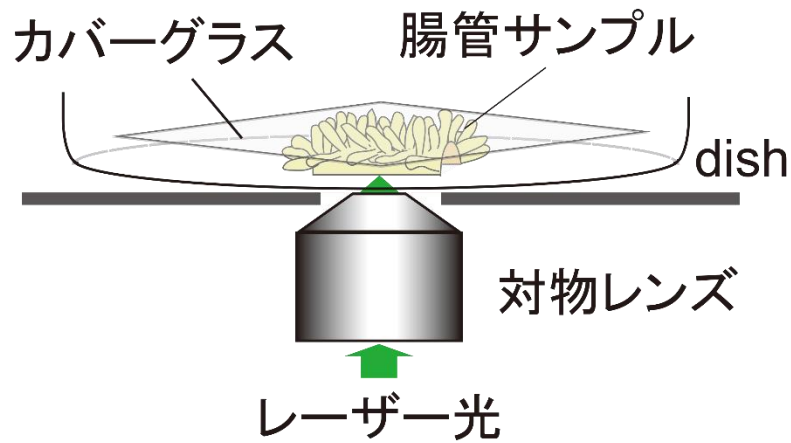
図 6-3 ctrl および cKO 雌マウスの出生直前から離乳までの体重測定グラフ

雌マウス (ctrl に対しては n=27 [day1]、n=17 [day8]、n=42 [day14]、n=17 [day21] ; cKO に対しては n=21 [day1]、n=15 [day8]、n=39 [day14]、n=15 [day21]) の体重は誕生から図に示したタイミングで観察した。18.5 dpc (E18.5) の仔は母マウスから取り除き、それらの雌の体重 (ctrl、n=8 ; cKO、n=20) を測定した。胎児および乳幼児の性別は Y 染色体の Zfy 遺伝子座の PCR 増幅により決定された。エラーバーは SEM を表し、p 値はグラフ中に示されている。



図i whole mount 小腸の作製

この図では、whole mount 小腸の作製方法について示した。まず、新生児マウス (P2) もしくは胎児期マウス (18.5dpc) を断頭により安楽死させ、小腸を摘出した。摘出した小腸は中央より下部で1-2mm 幅に輪切りにした。輪切りにした小腸は、ヴァンナス型剪刀を用いて展開することで管腔側が外側を向くようになり、絨毛がむき出しの状態となった。これを whole mount 小腸として用いた。



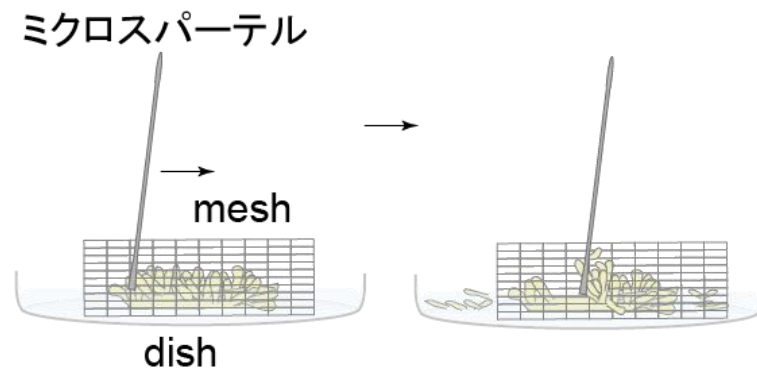
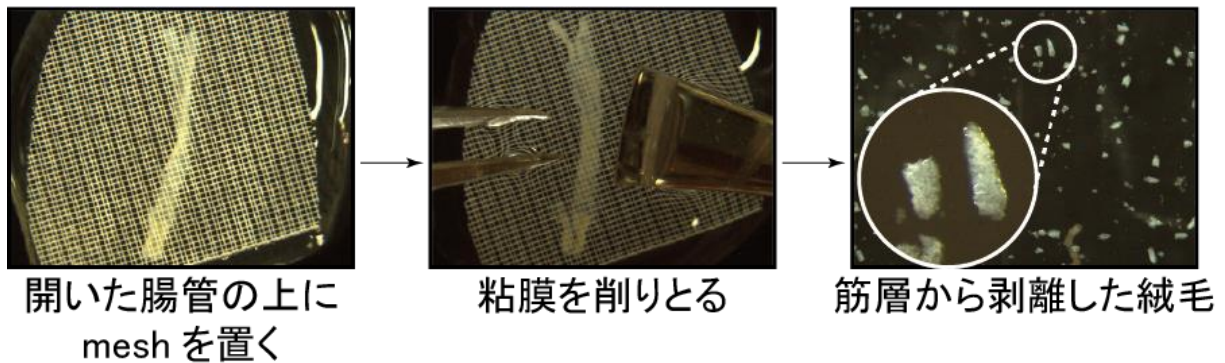
焦点を当てた部位



新生児期マウスの絨毛の断面図

図ii 共焦点レーザー顕微鏡による whole mount 小腸の絨毛先端部の画像の取得方法

この図では、whole mount 小腸を共焦点レーザー顕微鏡で撮影する方法を示した。まず、vector shield でマウントされた whole mount 小腸を、ガラスベースディッシュの上に置いた。次に、この whole mount 小腸の上に少量の vector shield をマウントした。最後に、18mmx18mm のカバーグラスを空気が入らないように上から被せて組織を固定した。撮影の際は、絨毛の先端に焦点にレーザーを当て、画像を取得した。



図iii 筋層から腸粘膜を剥離させる方法

この図では、胎児期および新生児期マウスの小腸の腸上皮を擦り取る手法を示した。まず、図iで示したように whole mount 小腸を取得し、dish の上に乗せる。次に、目開き 300 μ m のナイロンメッシュ（細かく切ったサンプルパック）を whole mount 小腸の上に乗せ、およそ 600 μ l の ice-cold PBS (-) を加える。最後にメッシュをピンセットで固定し、マイクロスパーテルのヘラの部分でメッシュの上から whole mount 小腸の上皮を擦り取る。すると、上皮が筋層から分離し、上皮のみを含む PBS をピペットマンで回収することが可能となる。回収した液から極力、腸間膜や赤血球を除去するため、whole mount 小腸を得る段階で腸間膜や血管をピンセット等で取り除く。もしくは、回収した液を遠心した後、ピペットマンを用いて取り除く。

class I VAM	class II VAM
VAM1 (VPS11)	VAM2 (VPS41)
VAM5 (VPS33)	VAM3
VAM8 (VPS18)	VAM4
VAM9 (VPS16)	VAM6 (VPS39)
	VAM7

表1 VAM 遺伝子およびその分類

酵母で同定された9種類のVAM遺伝子のうち、クラスIに分類されるVAM遺伝子を左列に、クラスIIに分類されるVAM遺伝子を右列に記した。また、括弧内には、各々のVAM遺伝子に対応するVPS遺伝子を記している。

表 2

	アレル			性別	
	<i>Rab7</i> ⁺	<i>Rab7</i> ^{lox}	<i>VilCre</i> ^{Tg/+}	雄	雌
プライマーセット					
Rab7-S15, Rab7-A16	321 bp	831 bp			
Cre-Fw, Cre-Rv			369 bp		
Zfy-Fw2, Zfy-Rv2				195 bp	

表 3

プライマー	配列	詳細
Rab7-S15	5'- GGATAAAATAGCAGTAAAAGCACGGTCGGG-3'	<i>Rab7</i> intron 3-4, sense strand
Rab7-A16	5'- GGTGGATTTTTCTGAGTTTGAGGCCAGCCT-3'	<i>Rab7</i> intron 3-4, antisense strand
Cre-Fw	5'- ACCTGAAGATGTTTCGCGATTATCT -3'	Bacteriophage P1, Cre recombinase sense strand
Cre-Rv	5'- ACCGTCAGTACGTGAGATATCTT -3'	Bacteriophage P1, Cre recombinase antisense strand
Zfy-Fw2	5'-TGGGTAGCCACATGCTTCTTGA-3'	Mouse Y chromosome, Zfy1 locus sense strand
Zfy-Rv2	5'-GGCTCAGCAACATGCCGTTCT-3'	Zfy1 locus antisense strand